



UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA E BIOQUÍMICA DE UM ACTIVADOR  
DO FACTOR X DA COAGULAÇÃO PRESENTE NO VENENO DA SERPENTE  
*BOTHROPS ERYTHROMELAS***

JOSÉ RICARDO FERNANDES BÔTO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

**CONSTITUIÇÃO DO JÚRI**

Doutor Carlos Mendes Godinho de Andrade  
Fontes

Doutor José Henrique Duarte Correia  
Doutora Anabela de Sousa Santos da Silva  
Moreira

**ORIENTADOR**

Doutora Ana Marisa Chudzinski Tavassi

**CO-ORIENTADOR**

Doutora Anabela de Sousa Santos da Silva  
Moreira

2016

LISBOA

---

## **Agradecimentos**

---

Antes de mais queria agradecer aos meus Pais e irmãos por me terem apoiado sempre em todas as minhas decisões e me terem suportado e encorajado a seguir os meus sonhos e a fazer tudo o que eu achava que seria melhor para mim. Sem eles nunca teria chegado aqui. Obrigado.

Gostaria de agradecer à minha Orientadora Ana Marisa Chudzinski Tavassi por ter acreditado em mim e por me ter dado esta oportunidade, por me ter ajudado e encorajado nos momentos em que pouca era a minha esperança, sem ela nada disto poderia ser possível.

Quero agradecer também à minha Co-orientadora Anabela Moreira por todo o tempo que passou comigo, por me ter aturado, por todos os óptimos conselhos e pela força que me deu, o qual sem ela este trabalho não seria uma realidade.

Quero igualmente agradecer muito à Juliana Sciani pela amizade, pelas palavras quentes e encorajadoras nos momento mais difíceis, pelo optimismo e acima de tudo por todo o trabalho que teve comigo a guiar-me em quase todos os passos deste trabalho. Aprendi tanto com ela e por toda a ajuda sinto que este trabalho é quase tanto meu quanto dela e por isso um grande obrigado.

Quero agradecer também muito à Isabel Batista por toda ajuda e carinho que me deu também durante o meu trabalho, por me ter ensinado tanto e sempre com muita paciência e amor.

Quero agradecer também ao Rafael Marques-Porto por também me ter ajudado imenso no meu trabalho durante algumas técnicas e por ter sido sempre um grande amigo.

Quero dar um grande agradecimento a todas as pessoas do laboratório de Bioquímica e Biofísica do Instituto Butantan por me terem ajudado e estarem lá para mim e por me terem acolhido tão rapidamente quase como se fosse da família. Como é de esperar criamos certas afinidades com as pessoas com quem contactamos mais e que de uma maneira ou de outra nos marcam. Estou muito grato a essas pessoas pois senti-me como se estivesse em casa. Por isso obrigado Vania Goulart, Pâmela Bouffleur, Cicília Carvalho, Tathiane Schiabe, Heleusa Sampaio, Fernanda Faria, Kerly Pasqualoto, Paola Alvarez-Flores, Sônia Andrade, Ana Sato, André Sanson, Douglas Mariano, Gustavo Viegas, Rose Bosch, Sônia Will, Yacov Rodrigues, Camila Zago, Chaima Bensaoud, Asif Lqbal, Marcelo Frungillo, Mario Pacheco, Jean Souza, Susana Lucatto, Viviane Barbosa e Caroline Freitas.

Quero agradecer também ao laboratório de Herpetologia do instituto Butantan por todas as oportunidades de aprendizagem que me deram e também na ajuda na colheita de veneno, em especial ao Sávio Sant'Anna e à Kathleen Grego.

Quero agradecer com muito amor à minha família brasileira que me deram muito amor e carinho durante os rápidos 6 meses que é composto por alguns dos nomes supracitados e por Maria Cely, Evandro Almeida, Hudson Rosa, Marcell Crispim, Caroline Casaroli e João Nascimento a estes um muito obrigado por todos os momentos de alegria que me proporcionaram.

Quero agradecer ao resto da minha família: cunhados, sobrinhos, tios, primos e padrinhos por todo o amor que me têm dado e todo o apoio.

Quero agradecer à minha “família” portuguesa que são os meus xoos e não xoos a eles devo os melhores anos da minha vida com muitas alegrias e tristezas com agradecimento especial para o quarteto “cócó (Bruno Duarte), ranheta (Raquel Duarte), facada (eu mesmo) e ponto final (Sara Abreu)”, Catarina Cardoso, Gabriela Ferreira, Maria Lopes, Eloy Alves, Alexandre Botelho, Virgínia Pires, Bruna Freire, José Coucelo, João Cotta, Tiago Magalhães e Wendy Alexandre.

Ainda pertencente à família um obrigado especial para a minha grande amiga e companheira Lúcia Gomes pela nossa bela amizade e por todos os momentos de felicidade (que envolveram sempre comida e bebida).

Um especial obrigado também à pessoa que mais me atura em base diária e quem considero um grande amigo Luís Costa.

A todos os que ficaram por mencionar mas que decerto nunca serão esquecido e que contribuíram para que eu fosse uma pessoa melhor, um muito obrigado.

“In Science, chance favors the prepared mind!”, by R. Manjunatha Kini

### **Isolamento e caracterização biológica e bioquímica de um ativador do factor X da coagulação presente no veneno da serpente *Bothrops Erythromelas*.**

O envenenamento por zootoxinas é um problema de saúde pública que, dependendo da região, pode ser muito grave; contudo, os venenos são substâncias com grande potencial no campo da medicina, diagnóstico e investigação. Neste trabalho foi isolada e caracterizada uma nova proteína do veneno da serpente *Bothrops erythromelas* com capacidade de activar o factor X da cascata da coagulação.

Esta proteína foi obtida por uma cromatografia de filtração em gel com recurso à coluna TSKgel G2000SW (Tosoh BioScience®), tendo sido posteriormente caracterizada como uma proteína pertencente à família das metaloproteases com 49039 Daltons por espectrometria de massa.

O ponto de clivagem desta proteína no factor X humano situa-se entre os aminoácidos Glu<sub>310</sub>-Ser<sub>311</sub>, sendo que fisiologicamente ocorre entre os aminoácidos Arg<sub>194</sub>-Ile<sub>195</sub>, ambos na cadeia pesada do factor X.

A proteína agora identificada e caracterizada é capaz de activar o factor X mesmo com baixas concentrações de cálcio e a sua inibição só ocorre em presença de uma concentração elevada de EDTA.

A importância desta proteína advém do facto da sua actividade se localizar no ponto de convergência da via intrínseca e extrínseca da cascata da coagulação, podendo eventualmente ter potencial como agente terapêutico, no que respeita à hemostase, como pro-coagulante ou como ferramenta em testes de diagnóstico e laboratoriais.

Palavras-chave: Activador do factor X, *Bothrops erythromelas*, veneno, metaloprotease, hemostase.

## Abstract

---

### **Isolation, biochemical and biological characterization of a coagulation factor X activator from the venom of the snake *Bothrops erythromelas*.**

Poisoning by zootoxins, depending on the region, is a serious public health hazard, however poisons are compounds with great potential in the medical, diagnosis and research field. In this work a new protein from the venom of *Bothrops erythromelas* snake has been isolated and characterized, which is capable of activating factor X of the coagulation cascade.

This protein was obtained by gel filtration chromatography using TSKgel G2000SW column (Tosoh Bioscience®). The protein was subsequently characterized, by mass spectrometry, as a protein belonging to the metalloproteases family with 49039 Daltons.

The cleavage site of the protein upon the human factor X lies between amino acids Glu<sub>310</sub>-Ser<sub>311</sub> in contrast with what happens physiologically, which is located between amino acids Arg<sub>194</sub>-Ile<sub>195</sub>, both cleaving factor X on the heavy chain.

This protein is still capable of activating factor X with very low concentrations of calcium and its inhibition occurs only with high concentrations of EDTA.

The interest in this protein comes from the fact that its activity centers at the convergence point of the extrinsic and intrinsic pathway of the coagulation cascade, indicating a potential therapeutic agent, regarding haemostasis, as a procoagulant or as a tool on diagnostic and laboratory kits.

**Keywords:** Factor X activator, *Bothrops erythromelas*, venom, metalloprotease, hemostasis.

## Índice

---

Agradecimentos .....	i
Resumo.....	iv
Abstract .....	v
Índice.....	vi
Índice de Figuras.....	x
Índice de Tabelas .....	xii
Lista de abreviaturas .....	xiii
Introdução .....	1
Capítulo I – Relatório de estágio curricular .....	4
Capítulo II – Revisão Bibliográfica .....	8
Factos históricos.....	8
Biologia.....	10
Bothrops erythromelas .....	15
Epidemiologia .....	18
Quadro clínico.....	19
Diagnóstico .....	22
Tratamento .....	25
Soro antiveneno e soroterapia.....	26
Cascata da coagulação .....	29
Hemostase primária.....	30
Hemostase secundária .....	31
Via extrínseca .....	32
Via intrínseca.....	34
Regulação da cascata da coagulação .....	34
FX.....	38
Cascata da coagulação e os venenos .....	39
Activadores de FX nos venenos .....	40
Metaloproteases .....	41
Composição do veneno .....	46
Usos e aplicações .....	49
Exemplos específicos do uso de venenos ofídicos.....	51
Técnicas laboratoriais usadas no estudo dos venenos.....	52

1. Técnicas de purificação .....	52
1.1. Cromatografia .....	52
1.1.1. Cromatografia de troca iónica .....	52
1.1.2. Cromatografia de filtração em gel.....	53
1.1.3. Cromatografia de fase reversa.....	53
2. Técnicas de caracterização .....	54
2.1. Estudo em substratos cromogénicos .....	54
2.1.1. Activação.....	54
2.1.2. Inibição.....	54
2.2. Análise da massa molecular.....	55
2.3. Estudo do ponto de clivagem.....	55
3. Técnicas de identificação.....	55
3.1. Sequenciação parcial por espectrometria de massa (EM).....	55
3.2. Sequenciação de aminoácidos pela técnica de degradação de Edman .....	56
4. Técnicas gerais .....	56
4.1. Dosagem proteica .....	56
4.1.1. Quantificação por ensaio do ácido bicinconínico .....	56
4.1.2. Quantificação for espectrofotometria.....	57
4.2. Análise electroforética por SDS-PAGE.....	57
Capítulo III - Isolamento e caracterização biológica e bioquímica de um activador do factor X da coagulação presente no veneno da serpente Bothrops Erythromelas .....	58
1. Objectivos.....	58
2. Material e Métodos.....	58
2.1. Colheita e processamento de Veneno Bruto .....	58
2.2. Purificação da proteína activadora de FX.....	59
2.2.1. Cromatografia de filtração em gel.....	59
Cromatografia de filtração em gel TSKgel G2000SW (Tosoh BioScience®) .....	59
2.2.1.1. Alterações ao método .....	59
2.2.2. Cromatografia de fase reversa.....	59
Cromatografia de fase reversa C4 (apHera™ - Sigma-Aldrich®).....	59
2.3. Caracterização biológica e bioquímica .....	60
2.3.1. Estudo de activação em substratos cromogénicos.....	60
2.3.1.1. Activação do FX.....	60
2.3.1.2. Activação da Protrombina .....	60



2.3.2.	Estudos de inibição .....	61
2.3.2.1.	Com recurso a compostos inibidores .....	61
2.3.2.2.	Sem adição de cálcio à reacção .....	62
2.3.3.	Análise da massa molecular com recurso a Ionização e dessorção a laser assistida por matriz (MALDI).....	62
2.3.4.	Determinação do ponto de clivagem por espectrometria de massa .....	62
2.4.	Sequenciação e identificação proteica.....	63
2.4.1.	Sequenciação parcial por espectrometria de massa (EM) .....	63
2.4.1.1.	Por extracção de bandas do gel de poliacrilamida .....	63
2.4.2.	Sequenciação de aminoácidos pela técnica de degradação de Edman .....	64
2.4.3.	Ferramentas de Bioinformática para avaliação dos resultados do espectrómetro de massa com recurso a MASCOT (Matrix Science) e PEAKS software® (Bioinformatics Solutions Inc.) .....	65
2.5.	Técnicas gerais .....	65
2.5.1.	Dosagem proteica .....	65
2.5.1.1.	Quantificação pela técnica do ácido bicinconínico .....	65
2.5.1.2.	Quantificação por espectrofotometria .....	65
2.5.2.	Análise electroforética por SDS-PAGE.....	66
3.	Resultados e Discussão .....	67
3.1.	Ensaio preliminares do veneno Bruto .....	67
3.1.1.	Dosagem e rendimento proteico do veneno bruto .....	67
3.1.2.	Avaliação do perfil proteico do veneno bruto .....	67
3.1.2.1.	Por electroforese SDS-PAGE .....	67
3.1.2.2.	Com recurso a MALDI-TOF .....	68
3.1.3.	Discussão .....	68
3.1.4.	Estudo de activação do veneno bruto .....	69
3.1.4.1.	Activação da protrombina .....	69
3.1.4.2.	Activação do FX .....	69
3.1.5.	Discussão .....	69
3.2.	Purificação .....	70
3.2.1.	Cromatografia de filtração em gel e Electroforese SDS-PAGE.....	70
3.2.2.	Cromatografia de filtração em gel e Electroforese SDS-PAGE - alteração ao método.....	73
3.2.3.	Cromatografia de fase reversa C4.....	75
3.2.4.	Discussão .....	76

3.3.	Identificação e sequenciação proteica.....	77
3.3.1.	Identificação proteica por Espectrometria de massa .....	77
3.3.1.1.	Perfil geral do veneno.....	77
3.3.1.2.	Proteína isolada .....	78
3.3.2.	Sequenciação de aminoácidos pela técnica de degradação de Edman.....	79
3.3.3.	Discussão.....	80
3.4.	Caracterização biológica e bioquímica .....	81
3.4.1.	Doseamento proteico.....	81
3.4.2.	Determinação da massa molecular.....	81
3.4.2.1.	Estudo de Activação do FX e da protrombina na proteína em estudo .....	82
3.4.3.	Estudo de inibição .....	82
3.4.3.1.	Acção do Cálcio na reacção.....	82
3.4.3.2.	Efeito dos inibidores no veneno bruto .....	83
3.4.3.3.	Efeito dos inibidores na proteína em estudo.....	83
3.4.4.	Determinação do ponto de clivagem no FX humano.....	84
3.4.5.	Discussão.....	85
4.	Conclusão.....	88
	Anexos.....	98
	Anexo 1 - Tratamento genérico dependendo do acidente ofídico. Segundo Wen e Malaque (2013). .....	98
	Anexo 2 - Proteínas hemostáticas, cofactores, inibidores e suas funções. Segundo Schalm's Veterinary Hematology 6th edition (Weiss & Wardrop, 2011) e Butenas e Mann (2002). ....	99
	Anexo 3 - Actividade Biológica e origem de alguns SVMP estudados até agora. Segundo S. Takeda et al. (2012) e Fox e Serrano (2009). .....	102
	Anexo 4 - Usos e aplicações de vários componentes de veneno de serpentes aplicados ao diagnóstico, à terapêutica clínica e à investigação científica. Segundo Perchuc e Wilmer (2010), Hutton e Warrell (1993) e (Chudzinski-Tavassi et al. (2014)). .....	103

## Índice de Figuras

---

Figura 1 - Enquadramento anatómico da fossa loreal numa fotografia da serpente <i>Bothrops erythromelas</i> . Segundo M. C. Smith (2011) e foto original.....	11
Figura 2 - Enquadramento anatómico da glândula de veneno no crânio dos viperídeos. Segundo Weinstein <i>et al.</i> (2009).....	13
Figura 3 - Classificação das serpentes de acordo com o tipo de dentição. Segundo Valenta (2010f), Kelley e Sagarin (2014) e <a href="http://www.kingsnake.com">www.kingsnake.com</a> (2015). ....	14
Figura 4 - <i>Bothrops erythromelas</i> . Original. ....	15
Figura 5 - <i>Bothrops erythromelas</i> , pormenor da cabeça. Original. ....	15
Figura 6 - Distribuição geográfica da <i>Bothrops erythromelas</i> . Segundo Jorge <i>et al.</i> (2015). .	16
Figura 7 - Distribuição geográfica de várias espécies de serpentes endémicas no Brasil, de acordo com exemplares recolhidos. Segundo Machado <i>et al.</i> (2014). ....	19
Figura 8 - Cascata da coagulação.....	32
Figura 9 - Cascata da coagulação evidenciando as principais interações dos venenos de serpentes na hemostase, bem como nas suas principais vias de regulação fisiológica. ....	36
Figura 10 - Estrutura esquemática dos domínios de cada classe das metaloproteases dos venenos de serpentes. Segundo Hsu e Huang (2010) e Matsui, Fujimura e Titani (2000). ....	43
Figura 11 - Esquema representativo do ensaio de activação de FX.....	54
Figura 12 – Gel SDS-PAGE do VB com e sem redução. ....	68
Figura 13 – Representação gráfica da massa molecular das proteínas presentes no VB com recurso ao MALDI-TOF. ....	68
Figura 14 – Gráfico da activação da protrombina a diferentes concentrações de VB. ....	69
Figura 15 - Gráfico da activação do FX a diferentes concentrações de VB. ....	69
Figura 16 – Representação gráfica da cromatografia de filtração em gel TSKgel G2000SW (Tosoh BioScience®). ....	71
Figura 17 - Gel SDS-PAGE (1/3) das fracções da cromatografia de filtração em gel TSKgel G2000SW (Tosoh BioScience®) (A1 a A11). ....	72
Figura 18 - Gel SDS-PAGE (2/3) das fracções da cromatografia de filtração em gel TSKgel G2000SW (Tosoh BioScience®) (A12 a C4). ....	72
Figura 19 - Gel SDS-PAGE (3/3) das fracções da cromatografia de filtração em gel TSKgel G2000SW (Tosoh BioScience®) (C5 a C11) e veneno bruto (VB). ....	73
Figura 20 - Representação gráfica da cromatografia de filtração em gel TSKgel G2000SW (Tosoh BioScience®) – alteração ao método.....	74

Figura 21 - Gel SDS-PAGE das fracções da cromatografia de filtração em gel TSKgel G2000SW (Tosoh BioScience®) (1 a 9) – alteração ao método.....	75
Figura 22 – Representação gráfica da cromatografia de fase reversa C4 (apHera™ - Sigma-Aldrich®).....	75
Figura 23 – Alinhamento das sequências do <i>bothropasin</i> e da <i>beryrthractivase</i> . ....	79
Figura 24 - Representação gráfica da massa molecular da proteína presente na fracção da cromatografia de fase reversa C4 (apHera™ - Sigma-Aldrich®) com recurso ao MALDI-TOF. ....	81
Figura 25 - Gráfico da activação do FX e da protrombina da proteína em estudo.....	82
Figura 26 - Gráfico da activação do FX do VB com e sem adição de cálcio.....	83
Figura 27 - Gráfico da activação do FX do VB com adição de PMSF, E-64 e EDTA. ....	83
Figura 28 - Gráfico da activação do FX da proteína de interesse com adição de EDTA (5 mM e 20 mM). ....	84
Figura 29 – Determinação do ponto de clivagem da proteína em estudo e do RVV-X na sequência proteica do FX humano.....	84

## Índice de Tabelas

---

Tabela 1 - Sinais clínicos secundários a hemorragia resultantes de um acidente ofídico. Segundo Berling e Isbister (2015). .....	20
Tabela 2 - Exames laboratoriais usados para diagnosticar e monitorizar VICC e a sua interpretação. Segundo Berling e Isbister (2015).....	23
Tabela 3 - Alterações laboratoriais que podem ser observadas segundo o tipo de acidente ofídico. Segundo Wen e Malaque (2013). .....	24
Tabela 4 - Alterações clínicas que podem ser observadas, segundo o componente presente no veneno e as possíveis serpentes responsáveis. Segundo Hutton e Warrell (1993). .....	24
Tabela 5 - Tratamento específico para os diferentes tipos de acidente ofídico segundo o grau de gravidade. Segundo Wen e Malaque (2013). .....	27
Tabela 6 - Protocolo de polimerização de SDS-PAGE para dois géis com 1 mm de espessura usando o equipamento da Biorad® .....	67
Tabela 7 – Identificação proteica das bandas das figuras 17 e 18 por espectrometria de massa. ....	78

## Lista de abreviaturas

---

A	Absorvância
ACN	Acetonitrilo
ADAM	Metaloproteases com domínio desintegrina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
APTT	Tempo parcial de activação da tromboplastina
AT-III	Antitrombina III
BCA	Ensaio do ácido bicinconínico
Ca <sup>2+</sup>	Cálcio
CID	Coagulação intravascular disseminada
CLAE ou HPLC	Sistema de cromatografia líquida de alta eficiência
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EM	Espectrometria de massa
FIX	Factor IX
FIXa	Factor IX activado
FT	Factor tissular
FT/VIIa	Complexo factor tissular e factor VII activado
FV	Factor V
FVa	Factor V activado
FVII	Factor VII
FVIIa	Factor VII activado
FVIII	Factor VIII
FVIIIa	Factor VIII activado
FvW	Factor de Von Willebrand
FX	Factor X
FXa	Factor X activado
FXI	Factor XI
FXIa	Factor XI activado
FXII	Factor XII
FXIIa	Factor XII activado
FXIII	Factor XIII
FXIIIa	Factor XIII activado
GP	Glicoproteínas
IgG	Imunoglobulina G
INR	Razão normalizada internacional
MALDI-TOF	Tempo de voo na Ionização e dessorção a laser assistida por matriz
MMP	Metaloproteases de matriz
mQ	Milli-Q <sup>®</sup>
NCBI	Centro nacional para a informação biotecnológica
PAI-1	Plasminogénio 1
PI	Ponto isoelectrico

PITC	fenil-isotiocianato
PMSF	Fluoreto de Fenilmetilsulfonil
PT	Tempo protrombina
PTH	feniltiohidantoína
RNAm	Ácido ribonucleico mensageiro
RVV-X	Activador de factor X da víbora de Russell
SDS-PAGE	Electroforese em Gel de Poliacrilamida com Dodecil sulfato de sódio
SVMP	Metaloproteases dos venenos de serpentes
SVMP P-I ou P-I	Metaloproteases dos venenos de serpentes classe I
SVMP P-II ou P-II	Metaloproteases dos venenos de serpentes classe II
SVMP P-III ou P-III	Metaloproteases dos venenos de serpentes classe III
SVMP P-IV ou P-IV	Metaloproteases dos venenos de serpentes classe IV
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametil etilenodiamina
TFA	Ácido trifluoroacético
TFPI	Inibidor da via do factor tissular
Tris-HCl	Tris(hidroximetil)aminometano com ácido clorídrico
VB	Veneno Bruto
VC	Volumes de coluna
VICC	Coagulopatia de consumo induzida por venenos
Zn <sup>2+</sup>	Zinco

## Introdução

---

A produção de substâncias tóxicas por animais, plantas e microorganismos há milénios que tem fascinado a humanidade, por razões práticas, maliciosas ou por curiosidade. Organismos venenosos estão amplamente difundidos em todo o reino animal, compreendendo mais de cem mil espécies distribuídas entre todos os principais *filos*. Em qualquer *habitat* há uma competição por recursos e em todos os ecossistemas existem organismos venenosos, sendo esta uma das técnicas mais fascinantes de capturar presas ou de defesa. Representa uma característica adaptativa e um exemplo de uma evolução convergente (Calvete, 2010).

Os artrópodes constituem a causa mais comum de envenenamento por animais, embora cerca de 80% das mortes por envenenamento em todo o mundo sejam causadas por serpentes. Contudo, o número anual de acidentes ofídicos e a mortalidade associada é difícil de estimar, uma vez que existem muitos países onde estas ocorrências não são devidamente notificadas (Calvete, 2010).

Há muito tempo que o estudo da fauna ofídica, a sua classificação, bem como os seus hábitos e actividades têm despertado grande interesse à humanidade. Devido à sua astúcia, ao seu rastejar ondulante, aos seus ataques inesperados e ao seu veneno, por vezes fatal, as serpentes causam temor e um horror não raro mórbido por parte dos seres humanos. Por isso, é fascinante estudar e descobrir características bioquímicas do seu veneno, aspectos fisiológicos e comportamentais destes seres, muitos dos quais são indiscutivelmente úteis à ciência (Bezerra, 2000). Os venenos são ‘*cocktails*’ mortais, cada um apresenta uma mistura única de peptídeos e proteínas naturalmente adaptadas pela selecção natural para agir sobre os sistemas vitais da presa. A potência biológica e a especificidade de algumas dessas toxinas presentes no veneno é verdadeiramente espantosa, e é aí que reside a maior parte da atracção pelos toxinologistas.

No entanto, apenas recentemente se tem intensificado o estudo destes compostos tornando a toxinologia uma disciplina formalizada. Como em muitas áreas da ciência, a toxinologia começou como uma disciplina essencialmente descritiva e as limitações técnicas restringiam a compreensão dos muitos compostos tóxicos produzidos pelos seres vivos. Há uma necessidade de investir no trabalho descritivo básico dos venenos e toxinas, tendo em conta que há venenos de várias espécies que são ainda inteira ou parcialmente desconhecidos. Embora tenha havido uma enorme evolução tecnológica, por vezes, torna-se difícil detectar aspectos subtis nas diferenças estruturais/funcionais em muitas moléculas que partilham alguma parte estrutural comum, mas com efeitos toxicológicos distintos. Assim, a toxinologia evoluiu para além do trabalho descritivo, passando a incluir aspectos de praticamente todas as



áreas da ciência (Mackessy, 2009). Hoje em dia, existem muitos grupos de investigação em todo o mundo que investigam o potencial dos venenos de serpente, a fim de encontrar novas ferramentas úteis em campos diferentes da medicina e de diagnóstico (Perchuc & Wilmer, 2010). De acordo com uma série de observações experimentais e clínicas, o uso de toxinas como ‘canivete suíço’ molecular tem permitindo a dissecação, clarificação de numerosos processos fisiológicos importantes, incluindo muitos aspectos da neurotransmissão, apoptose, hemostase e a transdução de sinal, bem como o seu tratamento em caso de patologia (Mackessy, 2009; Zhu *et al.*, 2015).

Os venenos de serpentes podem afectar, de forma notável, quase todos os componentes da hemostase, tais como a parede vascular, as plaquetas, os factores da coagulação, a fibrinólise e os anticoagulantes fisiológicos. Podem actuar de forma activadora, inibidora ou por degradação através de mecanismos enzimáticos ou de ligação. Estes efeitos podem contribuir para quadros hemorrágicos, bem como trombóticos ou um misto de ambos. A síndrome clínica mais proeminente é a coagulopatia de consumo que, na maioria das situações, pode prontamente ser revertida pelo soro antiveneno (Kini, Clemetson, Markland, McLane, & Morita, 2010, p. 699). Contudo estes reservatórios de moléculas, quando purificadas, podem auxiliar a perceber os mecanismos biológicos da hemostase e até servir como potenciais fármacos (Markland, 1997).

Tem havido um esforço conjunto por parte da comunidade científica de várias áreas tais como da biologia, da química de proteínas, da biologia molecular, da farmacologia, da toxinologia e da biologia estrutural, para a compreensão dos mecanismos de acção, das relações estrutura/função, da análise da sequência e actividade biológica dos venenos (McCleary & Kini, 2013a).

A toxinologia ofídica tem-se focado num ou mais dos seguintes objectivos: determinação do mecanismo de acção das toxinas; encontrar formas para neutralizar a toxicidade e os efeitos adversos do envenenamento; desenvolvimento de ferramentas de investigação específicas úteis para a compreensão dos processos fisiológicos normais a nível celular e molecular; e desenvolvimento de potenciais fármacos com base nas toxinas.

A este respeito, as novas moléculas descobertas abrem novas perspectivas para a investigação básica e aplicada. Devido às suas propriedades bioquímicas e farmacológicas, estas moléculas podem apontar novos mecanismos de acção, interacções moleculares ainda não descobertas e novas classes de enzimas e inibidores (Chudzinski-Tavassi, Carrijo-Carvalho, Alvarez-Flores, & Andrade, 2014).

Os venenos de serpentes são uma das fontes mais ricas de factores hemostáticos exógenos, entre eles, proteínas pró-coagulantes (Chudzinski-Tavassi *et al.*, 2014). Os activadores de

factor X (FX) têm sido descritos no veneno de várias espécies de serpentes pertencentes aos géneros *Viperidae* e *Crotalidae*, bem como a partir de algumas espécies de *Elapids*. A activação do FX ou inibição do factor X activado (FXa) tem uma elevada importância visto que este factor da coagulação é um dos principais alvos para o controle da hemostase. Muitas proteínas foram identificadas em venenos de serpente com propriedades de activação ou inibição do FX. Com base nas propriedades estruturais e funcionais os activadores de FX purificados de venenos de serpentes, podem ser metaloproteases ou serina endopeptidases. O activador mais conhecido é RVV-X<sup>1</sup> da víbora de *Russell* (*Daboia russelii*), sendo um dos melhores exemplos do uso de activadores de coagulação exógenos em investigação e, além disso, em muitos testes rápidos de diagnóstico (Tans & Rosing, 2001).

O Instituto Butantan nasceu em 1901 e começou a produzir soros hiperimunes e antiofídicos, resultando de pesquisas previamente iniciadas por Vital Brazil sobre o ofidismo. Ao longo dos últimos 100 anos, as demandas sociais foram atendidas ao mesmo tempo que o Instituto Butantan avançava nas investigações científicas nas áreas da biologia e da medicina experimental. Outros imunobiológicos passaram a ser produzidos, como os antivenenos contra escorpiões, aranhas e lagartas, as antitoxinas tetânica, diftérica e botulínica e soro anti-rábico.

---

<sup>1</sup> RVV-X do inglês *Russell's Viper Venom factor X activator*

## Capítulo I – Relatório de estágio curricular

---

O laboratório de Bioquímica e Biofísica do Instituto Butantan tem a seu cargo várias investigações e cooperações no ramo da toxilogia, da hemostase e novas moléculas anticancerígenas, entre outros. De facto, um composto anti-tumoral derivado de uma proteína presente na saliva de carraça, tem sido estudada neste laboratório com o apoio do Centro de Biotecnologia e está em fase avançada de estudo, com ensaios pré-clínicos em pessoas para breve. Sem investigação básica não existe desenvolvimento e produção, a associação entre produção e a investigação é fundamental.

Foi no espírito de fascínio e de curiosidade científica que embarquei nesta equipa maravilhosa com quem aprendi imenso.

O meu estágio teve lugar no Instituto Butantan e começou a 1 de Outubro de 2014 e terminou a 27 de Março de 2015. Durante este tempo foram-me ensinados vários conceitos e técnicas de bioquímica, tendo sido sempre acompanhado pela minha orientadora, Doutora Ana Marisa Chudzinski Tavassi, a Doutora Isabel Correia e a Doutora Juliana Sciani, entre outros profissionais no laboratório que me orientavam e assistiam sempre que necessário.

Ao longo deste período estive envolvido em dois projectos de investigação, o primeiro no estudo bioquímico e biológico do veneno de *Naja kaouthia*, em especial o seu efeito fibrinogenolítico, dando sequência a um projecto começado anteriormente, em colaboração com um grupo de investigação de Myanmar, que cedeu o veneno para o Instituto Butantan. Após 3 meses o projecto teve de ser suspenso devido a um problema na amostra e dado a impossibilidade de obter mais veneno em tempo útil. Assim, iniciei um segundo projecto, que é o tema da minha dissertação: “Isolamento e caracterização biológica e bioquímica de um activador do factor X da coagulação presente no veneno da serpente *Bothrops Erythromelas*”.

Durante o meu estágio tive oportunidade de aprender várias técnicas, tais como:

- Preparação de Soluções necessárias para *stock* e para os meus ensaios. Preparação do veneno para ensaios e análises.
- Determinação de concentração proteica por BCA no espectrofotómetro SpectraMax M Series (Molecular Devices®) e leituras no espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific®).
- Gel SDS-PAGE com concentrações diferentes (10-15%) de acordo com a amostra para determinação de perfil proteico.

- Coloração dos géis por Coomassie Brilliant Blue<sup>®</sup> R-250 (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>) e por Nitrato de Prata (Plat-Lab<sup>®</sup>), bem como a sua foto-documentação no Chemidoc MP (BioRad<sup>®</sup>).
- Estudos de degradação do fibrinogénio após a incubação com o veneno, por análise por SDS-PAGE.
- Zimografia para verificar actividade fibrinogenolítica, utilizando duas técnicas diferentes, a primeira com o substrato no próprio gel de corrida e a segunda por aposição de um gel de substrato ao gel de corrida.
- Ensaios de inibição proteica usando inibidores de cisteíno protease, metaloprotease e serina endopeptidase para determinação do tipo de proteína envolvida nos efeitos observados.
- Identificação de proteínas por técnicas de extracção de bandas do gel de poliacrilamida e análise por espectrometria de massa.
- Análise dos resultados do espectrómetro de massa em bases de dados *on-line* usando o MASCOT (Matrix Science) e PEAKS software<sup>®</sup> (Bioinformatics Solutions Inc.).
- Purificação de proteínas no veneno por cromatografia líquida usando diferentes técnicas CLC (Cromatografia líquida clássica) no sistema ÄKTA Purifier 100 (GE Healthcare<sup>®</sup>) e CLAE (cromatografia líquida de alta eficiência)<sup>2</sup> no sistema HPLC LC-10A (Shimadzu Corporation<sup>®</sup>). Foram usadas diferentes estratégias de purificação de acordo com as colunas utilizadas (colunas de troca catiónica, de troca aniónica, de filtração em gel e de fase reversa).
- Processamento e concentração da amostra por concentradores de vacuo<sup>3</sup> Speedvac RVC-2-18 CDPlus (Christ<sup>®</sup>) e por liofilização no liofilizador L101 (Liotop<sup>®</sup>).
- Ensaios de coagulação TTPA (Tempo de tromboplastina parcial activada).
- Cinéticas de Activação de FX e de activação de Protrombina no espectrofotómetro SpectraMax M Series (Molecular Devices<sup>®</sup>).
- Determinação do ponto de clivagem do FX pela proteína em estudo.
- Estudo comparativo entre a proteína em estudo e o RVV-X (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>), ensaios cinéticos e ponto de clivagem do FX.
- Análise do veneno e fracções no espectrómetro de massa MALDI-TOF Axima Performance (Shimadzu Corporation<sup>®</sup>).
- Processamento de veneno fresco após sua colheita.

---

<sup>2</sup> Também conhecido como HPLC do inglês *High Performance Liquid Chromatography*.

<sup>3</sup> Do inglês *Rotational vacuum concentrators*.

Algumas das técnicas, pelo seu grau de complexidade, a minha participação foi menor, técnicas como:

- Identificação proteica no espectrómetro de massa do tipo *electrospray* LCMS-IT-TOF™ (Shimadzu Corporation®).
- Colheita de veneno no laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan.
- Sequenciação de aminoácidos pela técnica de degradação de Edman PPSQ-21A (Shimadzu Corporation®).
- Microscopia intravital para avaliar o efeito da proteína de interesse na coagulação *in-vivo*, com recurso ao microscópio intravital Axio Imager 2 (Zeiss®).

Durante a minha permanência no Instituto Butantan tive a oportunidade de participar em alguns cursos e seminários dos quais destaco os que concederam certificado:

- XVI Reunião científica anual do Instituto Butantan.
- Curso teórico-prático “vias de administração de drogas e colecta de sangue em camundongos (*Mus musculus*)”, realizado no Biotério de roedores do Laboratório de Bioquímica e Biofísica do Instituto Butantan.
- Curso de Verão sobre “conceitos Básicos para o Estudo de Toxinologia” com carga horária de 30 horas.
- Actividade teórico-prática “da serpente ao soro antipeçonha”.
- Curso de “Animais Peçonhentos” com carga horária de 4 horas.
- Curso de “Tópicos avançados em Herpetologia: anatomia, fisiologia e manutenção de serpentes em cativeiro” com carga horária de 20 horas.
- Curso de “O que fazer em caso de acidentes por animal peçonhento” com carga horária de 4 horas.

Após a minha permanência no Instituto Butantan, Brasil fui três meses (1 de Abril 2015 a 30 de Junho 2015) ao abrigo do programa *Erasmus Plus* para a clínica de répteis da Faculdade de Veterinária e Ciências Farmacêuticas de Brno, República Checa, sob a orientação do médico veterinário Professor Doutor Zdenek Knotek diplomado pelo colégio europeu de medicina de zoo na especialidade de herpetologia. É considerado um dos mais conceituados clínicos de répteis a nível mundial e a sua clínica é uma referência, sendo a única a nível europeu com especialização e atendimento exclusivo de répteis.

Durante este estágio obtive prática clínica em medicina de répteis e anfíbios. A minha participação passou por várias actividades tais como:

- Preparação e administração de medicamentos;
- Contenção de animais;
- Exames físicos e identificação de espécies;
- Exames complementares como colheita de sangue, RX, exames parasitológicos e citológicos;
- Assistência em cirurgias como anestesista, circulante e 2º cirurgião;
- Necropsias e seus relatórios;
- Discussão clínica de alguns casos;
- Assistência na alimentação dos animais.

Assisti a um seminário de cirurgia com componente prática “Ressuscitação Cardiopulmonar em animais de companhia”.

Durante a minha permanência na República Checa tive oportunidade de fazer um curso de língua Checa na faculdade com direito a 2 ECTS, no qual após exame escrito e oral obtive nota “excellent”.

## Capítulo II – Revisão Bibliográfica

### Factos históricos

---

Poucas criaturas na história do Homem têm atraído tanta atenção quanto as serpentes. Uma das primeiras tentativas de descrever uma serpente na literatura pode ser encontrada na Bíblia, onde é descrito em Génesis 3:1 do Antigo Testamento como “A serpente era o mais astuto de todos os animais selvagens que o Senhor Deus tinha feito”. A serpente, neste caso, é vista pela religião católica como um representante do mal. Contudo o culto da serpente tem desempenhado um papel visível em muitas culturas, religiões e tradições. Por exemplo, na história do Egipto, a insígnia dos reis era a cabeça de uma cobra na posição vertical com o ‘capuz’ aberto, potente símbolo da divindade e poder dos faraós, enquanto que para muitos outros povos ancestrais, a serpente simbolizava fertilidade e sabedoria.

Assim, o papel das serpentes na história da humanidade é evidente, bem como a sua influência sobre o estado da mente humana. A ofidiofobia (medo de serpentes) é incomparável a qualquer outro medo provocado por outros animais. Por que razão são tão mitificadas? Responder a esta pergunta não é simples, podendo haver vários factores envolvidos: o seu veneno, o perigo mortal iminente e o potencial de deixar sequelas graves após uma só mordedura. Estes são, de certeza, os factores mais importantes para as pessoas. Na verdade, é isto que distingue as serpentes de outros animais muito maiores, criaturas cujo ataque resultaria em devastação física visível, ao contrário da mordedura 'divina' de uma serpente venenosa (Valenta, 2010e). No entanto, como já referido, há centenas de anos que muitas outras culturas veneram e acreditaram no poder de cura das serpentes. Na verdade, esta é o símbolo da medicina devido à sua associação com Asclépio, o Deus grego da medicina, o que destaca o seu carácter verdadeiramente mítico (Calvete, 2009).

O nascimento da toxínologia experimental moderna deu-se, em 1664, por Francesco Redi (1626-1697), médico da corte Ferdinando II de Medici, Grão-Duque da Toscana, e seu sucessor, Cosimo III, por ter descoberto como a produção de veneno é feita pelas víboras e de que modo é inoculado nas suas presas, evidenciando assim o aparelho do veneno das serpentes. As suas observações foram publicadas, em 1664, como uma carta para Lorenzo Magalotti, intituladas de “*Osservazioni Intorno alle Vipere*” (Observações acerca de Víboras) (Calvete, 2013). Mais tarde, este trabalho esteve na base de um estudo sobre toxínologia animal pelo italiano Felice Fontana (1720-1805), descobrindo em 1787, que a administração endovenosa de uma pequena dose de veneno de víbora num coelho tinha a capacidade de induzir coagulação sanguínea, resultando na morte do animal. A análise macroscópica dos vasos do animal mostrou uma coagulação intravascular maciça (Zappellini, 1991).

### **Exemplos de como a Toxinologia evoluiu:**

- Em meados de 1800, estudos realizados por Mitchell e Reichert sugeriram a existência de actividade proteolítica no veneno de Cascavel com base nas suas observações de que o fibrinogénio no sangue animal perde a sua capacidade de coagular após a exposição ao veneno (Markland & Swenson, 2013).
- Calmette (1894) foi o primeiro a preparar um soro antiveneno para uso médico contra mordeduras de serpentes, tornando-se então, o real promotor da terapia com antiveneno. Depois disso, muitos cientistas começaram a desenvolver antivenenos nos seus próprios países.
- No Brasil, Vital Brazil, em 1901, utilizando os protocolos de Calmette, foi o primeiro investigador a demonstrar a especificidade dos soros antiofídicos, o que levou ao grande desenvolvimento da eficácia na soroterapia no mundo. Partindo dessa descoberta, no mesmo ano, o Brasil já possuía soros antiofídicos mono e polivalentes para uso médico (Bezerra, 2000).

Durante a maior parte do século XX, toxinologistas moleculares focaram as suas investigações em descobrir a estrutura e as propriedades biológicas e bioquímicas de toxinas isoladas. Este tipo de investigação tem sido continuamente aprimorada pelos avanços tecnológicos, em particular, o surgimento de tecnologias ‘omic’ (do início do século XXI) têm revolucionado a investigação biológica. Embora algumas das ferramentas em proteómica sejam anteriores à era genómica, a maior diferença da ciência moderna em relação à bioquímica clássica/química de proteínas é a escala e a precisão com que os dados podem ser gerados, bem como a capacidade de integrar todas essas informações em todo o sistema biológico. Por isso, os avanços nos instrumentos e nas metodologias de alto rendimento têm alimentado uma expansão no âmbito dos estudos biológicos de análises bioquímicas simples, que envolvem poucas moléculas de cada vez para um estudo sistemático de genomas inteiros, transcriptomas e proteomas. A última década, em particular, testemunhou o desenvolvimento de técnicas e estratégias para a avaliação da composição das toxinas presentes nos venenos de serpentes (‘venómica’), directamente (através de abordagens centradas na proteómica) ou indirectamente (via análise transcriptómica da glândula de veneno e com recursos a análises de bioinformática), num curto espaço de tempo e relativamente acessível (Calvete, 2013).



O nome ‘cobra’ é um termo comum usado para serpentes. Contudo, o termo pode levar a alguma ambiguidade dado que é também o nome dado para descrever serpentes do género *Naja*. Assim sendo, ao longo deste trabalho apenas irá ser usado o termo serpente.

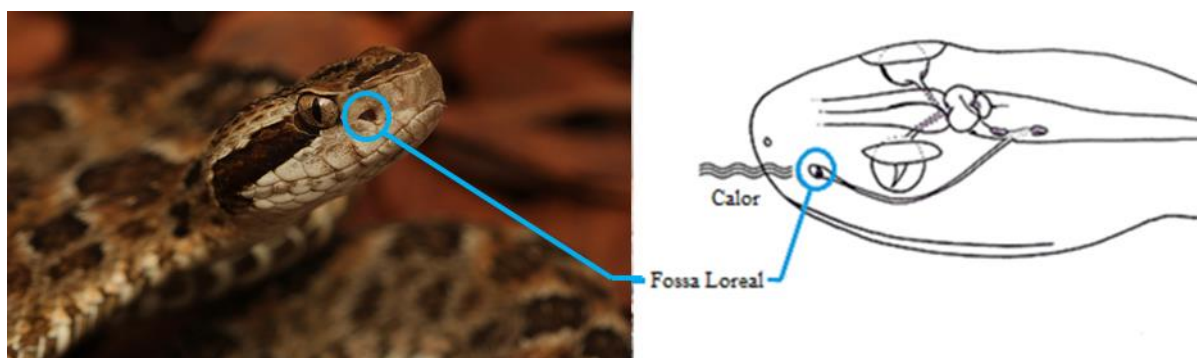
As serpentes surgiram há mais de 125 milhões de anos, no Cretáceo inferior, e estão distribuídas por todos os continentes, excepto a Antártica, concentrando-se mais nas zonas tropicais, subtropicais e temperadas. A classificação taxonómica agrupa as serpentes na subordem *Ophidia* ou Serpente, e, juntamente com lagartos e anfísbrenas a ordem *Squamata*, subclasse *Lepidossauria* e classe *Reptilia*. Actualmente são encontradas, aproximadamente, 3.000 espécies de serpentes em todo o mundo, distribuídas em 18 famílias e 420 géneros (M. Silva, 2002). As serpentes são divididas em dois grupos principais. Os *Scolecophidia* com cerca de 340 espécies, são pequenas cobras fósseis que se alimentam principalmente de formigas e térmitas. Todas as outras serpentes pertencem à infra-ordem *Alethinophidia* com cerca de 2.640 espécies (Quijada-Mascareñas & Wüster, 2009).

Dependendo como as biotoxinas são produzidas e inoculadas os animais podem ser referidos como criptotóxicos e fanerotóxicos. Os primeiros não possuem qualquer estrutura específica para a inoculação das suas toxinas ou uma glândula especializada, o envenenamento faz-se por contacto ou ingestão do animal venenoso. Os animais fanerotóxicos são aqueles que possuem uma glândula especializada para a produção das suas toxinas, um reservatório e um ducto. As serpentes, quando possuem veneno, são animais fanerotóxicos, inoculando o seu veneno através de uma mordedura (Fox & Serrano, 2007; Valenta, 2010f).

Apenas cerca de 20% das serpentes são venenosas e, portanto, de importância médica. Estas podem dividir-se em quatro famílias *Elapidae*, *Viperidae*, *Colubridae* e *Atractaspididae*, contudo a maior parte dos acidentes ofídicos são devidos às famílias *Viperidae* e *Elapidae* (Berling & Isbister, 2015). Todavia, isso não significa que todas as serpentes sejam realmente perigosas em todas as circunstâncias, algumas delas são incapazes de inocular veneno através de uma mordedura defensiva devido às suas mandíbulas serem pequenas ou as presas estarem localizadas mais caudalmente. Enquanto isso, outras podem apenas causar náuseas ou ligeiros sintomas de envenenamento como resultado da quantidade de veneno inoculado. As restantes podem causar envenenamento grave com consequências potencialmente fatais (Valenta, 2010c). Regra geral serpentes da família *Viperidae* causam principalmente coagulopatias em contraste com as *Elapidae* que causam principalmente neuropatias (excluindo as de origem australiana) (Berling & Isbister, 2015; Lu, Clemetson, & Clemetson, 2005). As serpentes da família *Viperidae* formam um grupo cosmopolita, com membros amplamente distribuídos

tanto no Antigo como no Novo Mundo, com três subfamílias: *Azemiopinae*, *Viperinae* (as "verdadeiras" víboras) e *Crotalinae* (crotalíneos). Anteriormente agrupados noutra subfamília, os crotalíneos, reúnem actualmente 18 géneros incluindo 154 espécies, com tendência a aumentar (Valenta, 2010a). Os crotalíneos concentram-se no Novo Mundo e são distintos das demais serpentes devido a uma inconfundível característica, a presença de uma fossa profunda na região loreal (entre os olhos e as narinas) como se pode ver na Figura 1. O género *Bothrops* (do grego *βόθρος*, *bothros*, significa "fossa", e *ὄψ*, *ops*, significa "olho" ou "cara", alusivo à fossa loreal<sup>4</sup>), compreende 45 espécies e estas ocorrem principalmente na América do Sul, de acordo com o sistema de informação taxonómica integrada (ITIS, 2015; Öhler *et al.*, 2010; Sant'anna *et al.*, 2013). As serpentes deste género são responsáveis por mais morbidade humana no Novo Mundo do que qualquer outro grupo de serpentes venenosas (Estevao-Costa *et al.*, 2008).

Figura 1 - Enquadramento anatómico da fossa loreal numa fotografia da serpente *Bothrops erythromelas*. Segundo M. C. Smith (2011) e foto original.



No Brasil estão catalogadas 64 espécies de serpentes venenosas de importância médica distribuídas em duas famílias: *Viperidae* e *Elapidae*. A família *Viperidae* está representada pelos géneros *Bothrops* (jararacas), *Crotalus* (cascavéis) e *Lachesis* (surucucus); e pela família *Elapidae* pelos géneros *Micrurus* e *Leptomicrurus* (corais verdadeiras) (M. Silva, 2002). A classificação inicial das espécies e subespécies do género *Bothrops* que são conhecidas no Brasil foi realizada por Amaral (1923). O género *Bothrops* pode ser dividido em pelo menos sete grupos: 1. Grupo *Atrox*; 2. Grupo *Alternatus*; 3. Grupo *Jararaca*; 4. Grupo *Jararacussu*; 5. Grupo *Microphthalmus*; 6. Grupo *Taeniatus* 7. Grupo *Neuwiedi* no qual se encontra a espécie *B. erythromelas* (M. Martins, Marques, & Sazima, 2002), (Fenwick, Gutberlet, Evans, & Parkinson, 2009).

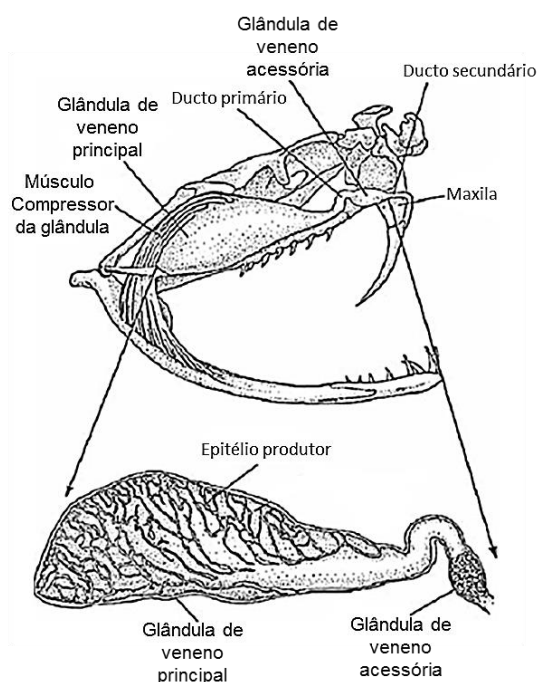
<sup>4</sup> Órgão termo-sensível capaz de detectar variações de temperatura na ordem de 0,003°C.

A classificação taxonómica das serpentes está longe de estar concluída e estável. As relações entre grupos taxonómicos bem como alguns géneros ainda estão a ser desenvolvidos e alterados. Ainda hoje, novas espécies são descobertas, algumas das quais aguardam descrição científica detalhada, enquanto outras foram recentemente classificadas em subespécies como resultado de um maior conhecimento da sua morfologia (Valenta, 2010f). Estas alterações podem levar a mudanças de nome científico, assim sendo, é importante estar atento às novas classificações para não criar ambiguidades no estudo de tais animais.

Nas serpentes, dependendo da espécie, o veneno pode ser produzida em dois tipos de glândulas: a de *Duvernoy* e a do veneno. A glândula de *Duvernoy* é constituída por várias células serosas e não apresenta lúmen para armazenamento ou músculo responsável pela libertação do veneno, sendo este libertado através da pressão realizada pela mandíbula da serpente no acto de alimentação ou defesa. Por outro lado, as glândulas de veneno possuem células cujo formato é triangular e o veneno produzido é armazenado. A inoculação e o movimento das presas inoculadoras de veneno são realizadas voluntariamente pelo controle muscular (Fox & Serrano, 2008; M. Silva, 2002). O veneno sai da glândula principal de veneno e desloca-se através de um ducto primário para a glândula acessória e daqui, através de um ducto secundário, para a base do dente tubular como se pode ver na Figura 2 (Weinstein, Smith, & Kardong, 2009).

Os viperídeos têm rostralmente longas presas, com capacidade móvel e estão dobradas para trás protegidas por uma membrana. Estas serpentes possuem o sistema de inoculação de veneno mais sofisticado, pertencendo ao grupo de serpentes solenóglifa, como se pode ver na Figura 3 (Gopalakrishnakone *et al.*, 2015; Hutton & Warrell, 1993; Zappellini, 1991).

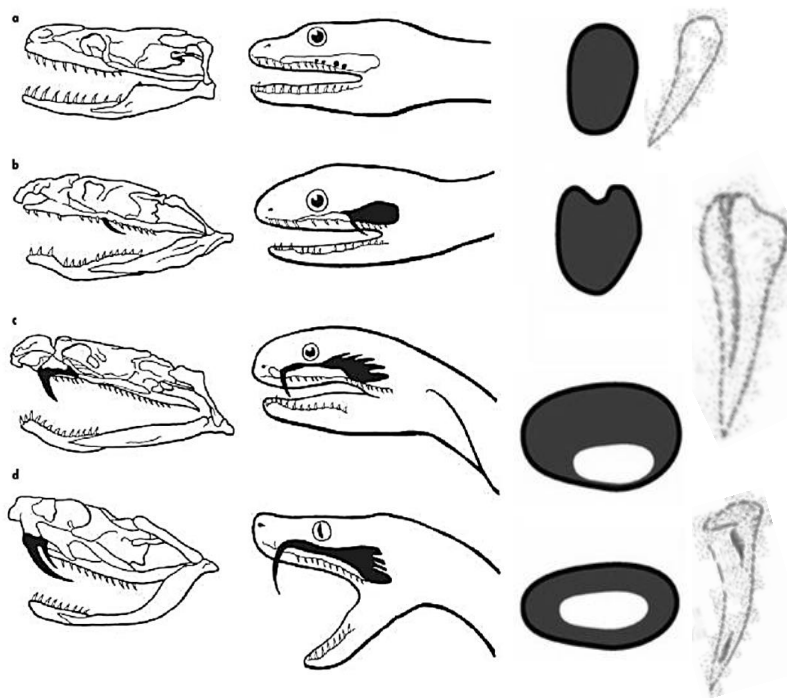
Figura 2 - Enquadramento anatómico da glândula de veneno no crânio dos viperídeos. Segundo Weinstein *et al.* (2009).



Segundo Valenta (2010f) e Sant'anna *et al.* (2013) as serpentes podem ser agrupadas, com base na sua dentição, em quatro grupos, consoante a posição ou ausência das presas inoculadoras de veneno (Figura 3):

- Grupo 1. Áglifa (sem dentes especializados para inoculação de substâncias tóxicas. Os dentes presentes são usados apenas para segurar e ingerir o alimento);
- Grupo 2. Opistóglifa (dente inoculador de veneno, sulcado, encontra-se na parte posterior do maxilar, apresentando assim, perigo altamente reduzido para o homem);
- Grupo 3. Proteróglifa (dentição característica das serpentes da família *Elapidae*. Apresentam dois dentes sulcados inoculadores de veneno na parte anterior do maxilar não retrácteis);
- Grupo 4. Solenógrifa (Dentição característica das serpentes da família *Viperidae*. Tipo de dentição altamente especializada na inoculação de veneno. Apresenta dois dentes retrácteis na parte anterior do maxilar, ocios, formando um tubo por onde escorre o veneno à semelhança de uma agulha).

Figura 3 - Classificação das serpentes de acordo com o tipo de dentição. Segundo Valenta (2010f), Kelley e Sagarin (2014) e [www.kingsnake.com](http://www.kingsnake.com) (2015).



a) Áglifa. b) Opistóglifa. c) Proteróglifa. d) Solenógrifa.

No que diz respeito a serpentes do gênero *Bothrops* a sua maioria habitam em florestas, mas algumas são encontradas em áreas de vegetação aberta ou até mesmo locais áridos. Caçam de forma passiva esperando que a presa chegue perto o suficiente para atacarem e atacam a partir de uma postura enrolada (M. Martins *et al.*, 2002). São o grupo de serpentes que causam mais problemas a nível de saúde pública no Brasil, no entanto, o proteoma dos venenos, até agora descritos, têm sido apenas de algumas espécies. A sua análise detalhada torna possível compreender a semelhança e diferenciação entre os venenos das diferentes espécies, correlacionando este conhecimento para a biologia e ecologia das serpentes e as patologias associadas com o envenenamento. Isto é particularmente interessante para os venenos das diferentes *Bothrops*, cujos efeitos clínicos que causam são análogos mas não iguais (Paes Leme *et al.*, 2009).

Dados dos hábitos alimentares destas serpentes indicam que a sua dieta é generalista e que apresenta uma mudança ontogénica (de presas poiquilotérmicas para presas homeotérmicas), dependendo muito do seu tamanho corporal. Esta mudança é, em certos casos, acompanhada numa mudança das propriedades pró-coagulantes dos venenos. Como resultado deste processo de diversificação, coloca-se a hipótese de que as toxinas presentes nos venenos iriam actuar em alvos distintos da coagulação em sistemas vasculares de mamíferos, aves, anfíbios ou até de invertebrados (Bernardoni *et al.*, 2014; Theakston & Reid, 1983). Vários estudos por

comparação do veneno entre jovens e adultos chegam à conclusão que os venenos de serpentes da família *Viperidae* podem ser dependentes da idade, o que vai ao encontro com a ontogenia encontrada (Furtado, Maruyama, Kamiguti, & Antonio, 1991). A existência destas variações nos venenos das serpentes apresenta sérias implicações, não apenas em termos clínicos e no tratamento dos doentes envenenados, mas também no ramo da toxinologia e na investigação com recurso a estes venenos ou como ferramentas biológicas (Calvete, 2010; M. Silva, 2002).

### **Bothrops erythromelas**

---

A serpente *B. erythromelas* (Figura 4 e Figura 5) é um crotalíneo terrestre de pequeno porte (a mais pequena do género, com aproximadamente 54 centímetros) (Jorge *et al.*, 2015), pertencente ao grupo *neuwiedi*, no qual fazem parte oito espécies (Machado, Silva, & Silva, 2014).

Figura 4 - *Bothrops erythromelas*. Original.

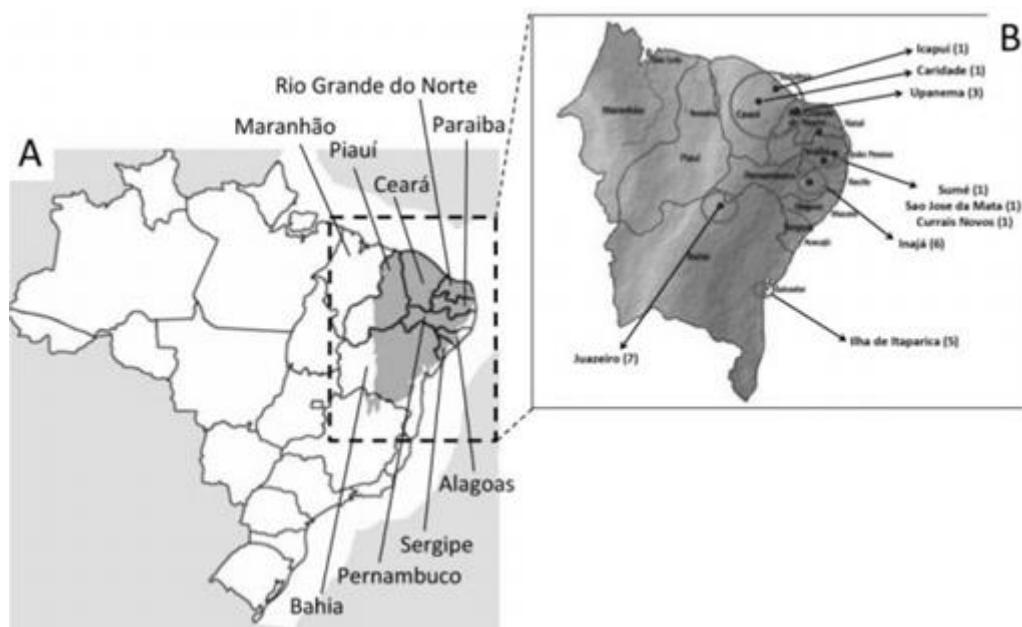


Figura 5 - *Bothrops erythromelas*, pormenor da cabeça. Original.



Apesar de não haver um dimorfismo sexual marcado, as fêmeas são, regra geral, consideravelmente maiores do que os machos. Foi descrita por Amaral (1923) e habita exclusivamente as regiões quentes e áridas do Nordeste Brasileiro da Bahia ao Ceará (caatinga) (Zappellini, 1991), como se pode ver na Figura 6. O nome científico *erythromelas* deriva do grego antigo, *έρυθρός* (*érythrós*), que significa "vermelho", e *μέλας* (*mélas*), que significa "preto", numa clara referência à coloração da serpente composta por uma cabeça que varia entre o castanho e o castanho-avermelhado e o dorso castanho-avermelhado com marcas triangulares escuras, como pode ser observado na Figura 4. É também conhecida como jararaca-da-seca, jararaca rosada ou jararaca avermelhada (Jorge *et al.*, 2015).

Figura 6 - Distribuição geográfica da *Bothrops erythromelas*. Segundo Jorge *et al.* (2015).



**A)** Distribuição da serpente nos diferentes estados no mapa do Brasil. **B)** Ampliação da zona onde foram encontradas exemplares desta serpente.

Como outras serpentes do mesmo gênero, possui um temperamento nervoso e irritável. Apesar do seu pequeno porte, é responsável pela maioria dos acidentes ofídicos nas regiões assinaladas (Feitosa, Melo, & Monteiro, 1997), resultando em perturbações hemodinâmicas profundas nos indivíduos expostos (Aird, 2004).

Segundo Silva *et al.* (2003) e Zappellini (1991), o veneno apresenta uma alta actividade coagulante, proteolítica (caseinolítica), hemorrágica e fosfolipásica. Esta espécie é particularmente interessante pelo seu potente efeito pró-coagulante via activação de factores da coagulação e não por actividade tipo trombina<sup>5</sup> (actividade semelhante à da trombina).

<sup>5</sup> Do inglês *thrombin-like*.

Como outras espécies de *Bothrops*, a actividade coagulante do veneno deve-se à marcada presença de activadores de protrombina e FX (M. B. Silva *et al.*, 2003; Vasconcelos *et al.*, 1998), tendo o mais potente activador de FX de todo o género (Furtado *et al.*, 1991) conferindo uma das mais potentes actividades pró-coagulantes (M. Silva, 2002).

Estudos de Vasconcelos *et al.* (1998) e Zamunér, Cruz-Hofling, Corrado, Hyslop, & Rodrigues-Simioni (2004) apontam outra particularidade do veneno desta espécie que é a sua baixa capacidade de se ligar ao tecido muscular, exibindo fraca miotoxicidade. Silva *et al.* (2003) descobriram uma proteína muito particular no veneno desta serpente, um activador de protrombina desprovido de actividade hemorrágica, a *berythractivase*. Outros componentes do veneno são as fosfolipases A<sub>2</sub> citolíticas e metaloproteases dos venenos de serpentes (SVMPs)<sup>6</sup> degradadoras da matriz extracelular, provocando a maioria dos efeitos locais e os peptídeos potenciadores de bradicinina que vão agir inibindo a enzima conversora de angiotensina I, aumentando assim o efeito hipotensor da bradicinina em circulação, contribuindo para o choque cardiovascular. Contém também uma série de serina endopeptidases, outras SVMP, proteínas similares à lectina tipo C e desintegrinas que podem interagir com os componentes do sistema hemostático afectando a cascata da coagulação sanguínea e a agregação plaquetária (Jorge *et al.*, 2015).

Segundo o estudo de Silva (2002) a inoculação de veneno de *B. erythromelas*, em cães, induz um quadro de hipercoagulabilidade, seguido de incoagulabilidade sanguínea em virtude do consumo dos factores II, V e X. Segundo Bezerra (2000) a DL<sub>50</sub> de *B. erythromelas* foi de 5,11 mg/kg (+/- 0,01), a dose de veneno capaz de induzir uma lesão necrótica de 25 mm de diâmetro (Dose Mínima Necrosante) foi de 78,38 µg/animal e a dose mínima coagulante do veneno foi de 21,37 µg/ml. Zamunér *et al.* (2004) avaliaram e compararam a DL<sub>50</sub> de algumas serpentes do género *Bothrops*, encontrando diferenças na ordem das 50 vezes entre o veneno mais potente (*B. erythromelas*) e o menos potente (*B. jararacuçu*).

De acordo com o Instituto Butantan, uma extracção equivale a 15 a 20 miligrama de veneno (Zappellini, 1991).

---

<sup>6</sup> Do inglês *snake venom metalloprotease*.



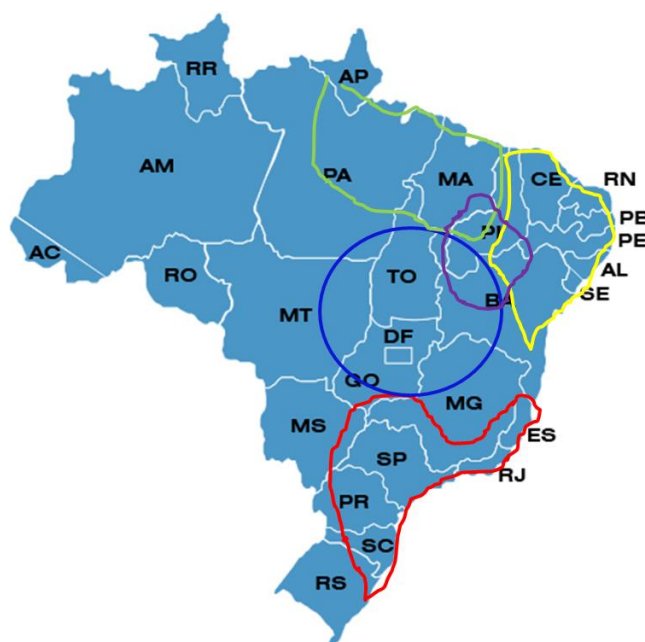
Segundo a Organização Mundial de Saúde os acidentes ofídicos são um problema de saúde pública nos países tropicais e subtropicais, sendo considerada uma doença tropical negligenciada responsável por inúmeras mortes em todo o mundo (WHO, 2015). É estimado que todos os anos no mundo ocorram pelo menos 421.000 acidentes por animais venenosos resultando em 20.000 mortes. No entanto, estes números podem estar subestimados, por falta de registos, podendo chegar a 1.841.000 casos de envenenamento com 94.000 mortes (Sánchez, Rodríguez-Acosta, Cantu, & Guerrero, 2010).

Serpentes dos géneros *Bothrops* e *Bothropoides* são responsáveis por mais casos de morbilidade no Novo Mundo que qualquer outro género de serpente venenosa (Estevao-Costa *et al.*, 2008), causando aproximadamente 80 a 90% dos acidentes ofídicos notificados a cada ano na América Latina (Camey, Velarde, & Sanchez, 2002; Sánchez *et al.*, 2010).

Dos acidentes registados 75,1% são de pessoas do sexo masculino, trabalhadores rurais (65,1%) e na faixa etária entre os 10 e os 49 anos (72,3%). A discrepância na proporção de homens, que são atingidos, em relação às mulheres prende-se com o facto de os homens estarem mais ligados a trabalhos no campo, onde estão mais expostos e vulneráveis. As regiões anatómicas mais frequentemente afectadas são os membros inferiores (81,9%) e superiores (14,7%), uma possível justificação é que as serpentes preferem viver no solo e a sua capacidade de defesa/ataque não ultrapassa um terço do seu comprimento. A falta de equipamentos de protecção individual em actividades rurais constitui um factor determinante na ocorrência de tais acidentes, a sua utilização poderia prevenir entre 50 a 75% dos acidentes ofídicos. Relativamente ao atendimento médico, a maioria dos doentes (86,6%) foram atendidos no prazo de até 6 horas após o acidente com predominância de casos leves (64,6%) e com fatalidade de 0,7% (Feitosa *et al.*, 1997; Oliveira, Brito, Morais, Fook, & Albuquerque, 2010).

Existe uma correlação entre a sazonalidade e a ocorrência de tais acidentes, sendo os meses de Abril a Setembro os de maior incidência. No Brasil existem várias espécies do género *Bothrops* que são responsáveis pela maior parte destes acidentes sendo cada espécie distribuída por diferentes regiões do Brasil, *Bothrops jararaca* (Sul e Sudeste), *Bothrops moojeni* (Centro-Oeste), *Bothrops atrox* (Norte) e *Bothrops erythromelas* (Nordeste), como se pode observar na Figura 7 (Boechat, Paiva, Franca, & Dos-Santos, 2001; Luna, Xavier, Pascoal, Martins-Filho, & Pereira, 2010).

Figura 7 - Distribuição geográfica de várias espécies de serpentes endêmicas no Brasil, de acordo com exemplares recolhidos. Segundo Machado *et al.* (2014).



Área delimitada a vermelho – *B. jararaca*; área delimitada a azul – *B. moojeni*; área delimitada a roxo – *B. lutzi*; área delimitada a verde – *B. atrox*; área delimitada a amarelo – *B. erythromelas*.

## Quadro clínico

Alguns dos acidentes ofídicos por serpentes venenosas não apresentem qualquer sinal clínico, isto deve-se ao facto das toxinas não terem sido inoculadas. Este acontecimento é conhecido como “*dry bites*” (mordeduras secas). Se o veneno for inoculado as toxinas são, normalmente, absorvidas em minutos (Rojnuckarin, 2010).

Serpentes da família *Viperidae* têm dos proteomas mais complexos entre os venenos de serpentes e oferece um intrigante desafio na compreensão da natureza dos seus componentes e os resultados patológicos tanto locais como sistémicos que possam advir do envenenamento (Paes Leme *et al.*, 2009).

O envenenamento por serpentes do género *Bothrops* causa um pronunciado efeito local e sistémico em seres humanos e animais (Zamunér *et al.*, 2004), tendo três principais acções:

**1) Proteolítica ou necrótica**, que determina vasodilatação, edema inflamatório na área atingida (estes efeitos locais podem levar a perda de tecidos, inviabilidade de um membro ou até mesmo a sua amputação (Boechat *et al.*, 2001; Ministério da Saúde do Brasil, 2001)). Os efeitos miotóxicos directos são devidos principalmente às SVMP (Bernardoni *et al.*, 2014) e às fosfolipases A<sub>2</sub>, ou indirectos devido à isquémia decorrente de lesão vascular, resultando em síndrome de compartimentalização (Gonçalves & Chudzinski-Tavassi, 2004);

**2) Coagulativa** - O principal alvo dos venenos de serpentes é a via comum da cascata da coagulação, incluindo os factores X e V e activadores da protrombina, resultando numa coagulopatia de consumo (VICC)<sup>7</sup>. Em alternativa, eles podem induzir coagulação actuando directamente no fibrinogénio através de enzimas tipo trombina. Em contraste com a trombina, o seu efeito é incompleto e libertam apenas um dos fibrinopeptídeos, A (venombin A) ou B (venombin B). Alguns podem clivar ambos os fibrinopeptídeos (venombin AB), mas não completamente, tal como não têm a capacidade de activar o factor XIII (FXIII) essencial para estabilização do coágulo. Assim, os coágulos formados são friáveis e submetidos a fibrinólise fisiológica e/ou induzida por veneno, causando hipofibrinogenemia humana. Activadores da coagulação também estão implicados, ocasionalmente, na microangiopatia trombótica (Chudzinski-Tavassi *et al.*, 2014; Rojnuckarin, 2010);

**3) Hemorrágica**, actuando no endotélio vascular da área afectada e, provavelmente, também em locais mais distantes. Dependendo do local e da gravidade onde ocorre a hemorragia podem advir outros sinais clínicos que não são directamente devido ao envenenamento, como se pode ver na Tabela 1.

Tabela 1 - Sinais clínicos secundários a hemorragia resultantes de um acidente ofídico. Segundo Berling e Isbister (2015).

Tipo de hemorragia	Sinais clínicos
<b>Hemorragia ligeira</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Hemorragia gengival</li> <li>- Hemorragia no local do cateter endovenoso</li> <li>- Hemorragia no local da mordedura</li> <li>- Hematúria</li> <li>- Epistaxe</li> </ul>
<b>Hemorragia gastrointestinal</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Hematemese</li> <li>- Hematoquezia e/ou melena</li> <li>- Diminuição da hemoglobina</li> </ul>
<b>Hemorragia intracraniana</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Coma</li> <li>- Sintomas neurológicos localizados</li> </ul>
<b>Hemorragia traumática</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Hemorragia dos locais lesionados</li> <li>- Hemorragia intracraniana pós queda</li> <li>- Hemorragia do mediastino pós lesões no peito</li> </ul>
<b>Hemorragia grave</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Diminuição grave da hemoglobina (necessidade de transfusão).</li> </ul>

O veneno possui outras actividades que podem constituir parte da sua fisiopatologia como: actividade fibrino(geno)lítica, actividade agregadora plaquetária (Oliveira *et al.*, 2010), necrose que pode ser acompanhada por leucocitose e neutrofilia (dependendo do tempo decorrido entre o envenenamento e o tratamento específico) (Flores, Zappellini, & Prado-

<sup>7</sup> Do ingles *venom induced consumption coagulopathy*.

Franceschi, 1993), choque, sépsis (Öhler *et al.*, 2010) e abscesso (ocorre primeiramente pela acção proteolítica do veneno e posteriormente pela acção bacteriana (bacilos Gram-negativos, anaeróbios e, mais raramente, cocos Gram-positivos) provenientes da boca do animal, da pele do acidentado ou do uso de contaminantes sobre o ferimento) (Bezerra, 2000). Estes fenómenos patológicos são complexos devido aos efeitos cumulativos e/ou sinérgicos de enzimas activadas e toxinas presentes nos venenos (Camey *et al.*, 2002).

Segundo um estudo de Oliveira *et al.* (2010), as reacções mais frequentes nas áreas da mordedura são dor intensa (95,9%), edema (87,1%) e equimoses (25,9%). Em relação a reacções sistémicas, tais como dor de cabeça, hemorragia, vómitos, tonturas, hematúria, náuseas, mialgia, anúria, oligúria, epistaxe, visão turva, observou-se que 57,1% dos doentes investigados não apresentaram nenhuma destas reacções sistémicas.

A complicação mais comum, entre os casos letais, após acidentes ofídicos no Brasil é de insuficiência renal aguda. Este processo pode ocorrer mesmo após o tratamento específico com antiveneno (A. Martins *et al.*, 2005) devido à hemólise intravascular e à deposição de fibrina nos capilares glomerulares (Senise, Yamashita, & Santoro, 2015)

Apesar das propriedades pró-coagulantes do veneno, devido à fibrinogenólise, estas toxinas tornam o sangue incoagulável (McCleary & Kini, 2013b). Esta incongruência deve-se ao facto do homem não ser o alvo preferencial destes animais. As presas destas serpentes são animais de pequeno porte onde, quando envenenados, ocorre coagulação sanguínea massiva em segundos, resultando em obstrução circulatória e morte rápida. Em pessoas devido ao seu maior volume de sangue, a quantidade de veneno inoculada não é suficiente para provocar os mesmos efeitos que são de esperar, por exemplo, num rato, resultando em VICC (Hutton & Warrell, 1993; Rojnuckarin, 2010), a não ser que a vítima seja exposta a uma grande quantidade de veneno (Valenta, 2010a).

Apesar de existirem diferenças, todas as toxinas pró-coagulantes causam um quadro clínico semelhante de consumo de factores da coagulação, resultando em coagulopatia. A gravidade clínica da VICC depende de quais os factores consumidos e a sua duração do tipo de toxina e da brevidade com que é administrado o soro antiofídico (Berling & Isbister, 2015; Gopalakrishnakone *et al.*, 2015).

O perfil geral do veneno de *Bothrops erythromelas*, assim como as demais do mesmo género, exhibe considerável actividade hemorrágica, fibrinolítica, proteolítica (por SVMP dependentes de zinco ( $Zn^{2+}$ ) que degradam a matriz extracelular) e actividade da fosfolipase A<sub>2</sub>. Induz edema e necrose e inibe a agregação plaquetária. A actividade miotóxica directa do veneno é baixa, o que sugere que as fosfolipases que ele contém têm outros alvos biológicos. A alta concentração de veneno na pele é compatível com efeitos clínicos causados por este veneno,

incluindo edema, dor, bolhas, equimoses e hemorragia (Jorge *et al.*, 2015; Vasconcelos *et al.*, 1998).

Apesar das variações existentes na composição química do veneno entre espécies e intra-espécie, em geral, existe uma semelhança nos sinais e sintomas apresentados pelos doentes mordidos por serpentes do género *Bothrops* (Boechat *et al.*, 2001). Contudo muitos clínicos descrevem que mordeduras de serpentes da mesma espécie e da mesma região geográfica podem apresentar um quadro clínico diferente, que pode depender não apenas das variações dos componentes dos venenos da mesma espécie, mas também das variações fisiológicas individuais de cada pessoa para essas toxinas. Reforçando a ideia de que de facto cada serpente pode ter uma composição diferente no seu veneno (Rodríguez-Acosta, Guerrero, & Sánchez, 2010).

A gravidade dos sinais clínicos está directamente relacionada com a quantidade de veneno inoculado, da periculosidade do veneno, da idiossincrasia e da zona do corpo afectada, que irá influenciar a velocidade de absorção do veneno para os tecidos e sistemas (Flores *et al.*, 1993; Valenta, 2010c).

## **Diagnóstico**

---

Quando se trata do diagnóstico de acidentes ofídicos o recomendado para verificar se um doente foi exposto a toxinas ou para seguir a sua evolução clínica é o tempo de coagulação sanguínea. É um teste rápido e facilmente disponível, mesmo em hospitais remotos com menos recursos. Se após 20 minutos não houver formação de coágulo é altamente preditivo de coagulopatia, sugerindo baixos níveis de fibrinogénio sendo indicada a administração de soro antiveneno (Rojnuckarin, 2010). Se existirem recursos e instalações laboratoriais equipadas, um estudo mais pormenorizado da coagulação é indicado. Estes devem incluir o tempo de protrombina (PT<sup>8</sup>) o tempo parcial de activação da tromboplastina (APTT<sup>9</sup>), o nível de fibrinogénio, produtos de degradação de fibrina e fibrinogénio e a contagem de plaquetas (este último geralmente, acompanhado de eritrograma e leucograma) (White, 2005). O fibrinogénio é, regra geral, o factor mais consumido em todos os tipos envenenamento conduzindo a VICC. O d-dímero é um marcador de degradação da fibrina proveniente da polimerização fisiológica do coágulo de fibrina, portanto, os níveis de d-dímero deverão estar significativamente aumentados em VICC resultante de toxinas pró-coagulantes como se pode ver na Tabela 2 (Berling & Isbister, 2015).

---

<sup>8</sup> Do inglês *Prothrombin Time*

<sup>9</sup> Do inglês *Activated Partial Thromboplastin Time*

Em algumas circunstâncias, a determinação específica de alguns factores pode ser útil para diferenciar os venenos que contêm efeitos tipo trombina dos que promovem a activação do FX, factor V (FV) ou especificamente a protrombina, permitindo ter uma ideia da espécie responsável pelo acidente. (Rojnuckarin, 2010).

Tabela 2 - Exames laboratoriais usados para diagnosticar e monitorizar VICC e a sua interpretação. Segundo Berling e Isbister (2015).

<b>Exame laboratorial</b>	<b>Interpretação do resultado para diagnóstico de VICC</b>
<b>Tempo de coagulação</b>	Teste não-padronizado com baixa sensibilidade, mas pode ser útil se realizado sob directrizes rígidas, especialmente em locais com poucos recursos.
<b>PT ou Razão Normalizada Internacional (INR) (feito em laboratório, pois os testes rápidos dão falsos negativos)</b>	Teste de diagnóstico mais útil em VICC. INR indeterminado indica VICC completa enquanto que um INR <3 ocorre com VICC parcial. Um INR é útil inicialmente para fazer o diagnóstico e, posteriormente, também para monitorizar a recuperação de VICC.
<b>APTT</b>	Será alterado ou indeterminado em VICC mas não acrescenta nenhuma informação ao PT / INR. Útil em coagulopatia anticoagulante onde irá estar elevado, enquanto o INR estará normal.
<b>D-dímero</b>	Resultado alterado em qualquer forma de VICC mas muito maior com activadores de protrombina. Deve ser pelo menos 10 vezes o limite superior para ser considerado alterado em VICC. Pode estar apenas levemente elevado sob o efeito da enzima tipo trombina.
<b>Produtos de degradação do fibrinogénio</b>	Um exame mais antigo que pode estar proporcionalmente mais elevado que o D-dímero com enzimas tipo trombina 50 a 100 vezes o normal.
<b>Fibrinogénio</b>	O melhor teste para definir VICC, sendo um ensaio da coagulação altamente sensível. Quando fibrinogénio indetectável indica VICC. No entanto, acrescenta pouco a um INR alterado no contexto clínico, excepto para casos muito ligeiros. O fibrinogénio é o factor mais lento a restabelecer valores normais, tornando-o menos útil para monitorar a recuperação de VICC no contexto clínico.
<b>Outros exames</b>	Ensaio específicos para certos factores podem ajudar a determinar o tipo de toxina pró-coagulante.

Os dados epidemiológicos são também muito importantes para determinar qual a espécie de serpente que provocou o acidente, pois sabendo quais as espécies endémicas da região onde ocorreu o acidente é possível ter, pelo menos, uma ideia da espécie responsável. Os sinais

clínicos específicos são igualmente preditivos de fornecer alguma informação relativamente à espécie responsável. (Tabela 3 e Tabela 4).

Tabela 3 - Alterações laboratoriais que podem ser observadas segundo o tipo de acidente ofídico. Segundo Wen e Malaque (2013).

Exame laboratorial	Acidente Botrópico	Acidente Laquéético	Acidente Crotálico	Acidente Elapídico
<b>Hemograma</b>	Leucócitos normais ou leucocitose, com neutrofilia. Pode ocorrer trombocitopenia.	Leucocitose, com neutrofilia. Pode ocorrer trombocitopenia.	Leucócitos normais ou leucocitose, com neutrofilia. Trombocitopenia é rara.	Leucocitose.
<b>Bioquímica</b>	Pode ocorrer aumento da ureia e creatinina; aumento da CK por efeito miotóxico local do veneno de algumas espécies; aumento da LDH e da bilirrubina devido a hemólise intravascular.	Registos escassos, perfil bioquímico provavelmente semelhante ao do acidente botrópico.	Aumento da CK (pode estar muito elevada, proporcional à gravidade); aumento da AST e LDH; aumento da ureia e creatinina (potássio também pode aparecer elevado); redução do cálcio na fase inicial da insuficiência renal aguda.	CK pode estar um pouco aumentado devido ao efeito miotóxico local do veneno de algumas espécies.
<b>Coagulação</b>	Normal ou aumento do TP, TTPA; TC alterado; diminuição do fibrinogénio; aumento dos produtos de degradação de fibrina e d-dímero.	Normal ou aumento do TP, TTPA; TC alterado; diminuição do fibrinogénio; aumento dos produtos de degradação de fibrina e d-dímero.	Normal ou aumento do TP, TTPA; TC alterado; diminuição do fibrinogénio; aumento dos produtos de degradação de fibrina e d-dímero.	Normal
<b>Urina tipo I</b>	Hematúria	Registos escassos	Normal na ausência de insuficiência renal aguda	Não descrito

Tabela 4 - Alterações clínicas que podem ser observadas, segundo o componente presente no veneno e as possíveis serpentes responsáveis. Segundo Hutton e Warrell (1993).

Quadro clínico	Componente do veneno	Espécies de serpentes normalmente responsáveis
<ul style="list-style-type: none"> <li>Sangue não coagulável;</li> <li>Hemorragia do local da lesão (zona da mordedura, locais de venopunção e feridas recentes).</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Pró-coagulantes</li> <li>Anticoagulantes</li> <li>Fibrinolíticos</li> </ul>	Muitas serpentes da família <i>Viperidae</i> , alguns elapídeos australianos e alguns colubrídeos.
<ul style="list-style-type: none"> <li>Trombocitopenia;</li> <li>Petéquias;</li> <li>Fraca retracção do coágulo.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Inibidores ou agregadores plaquetários.</li> </ul>	Muitas serpentes da família <i>Viperidae</i> , alguns elapídeos australianos e alguns colubrídeos.
<ul style="list-style-type: none"> <li>Hemorragia espontânea (gengivas, nariz, gastrointestinal, equimoses).</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Hemorraginas</li> </ul>	Muitas serpentes da família <i>Viperidae</i> , alguns elapídeos australianos e alguns colubrídeos.
<ul style="list-style-type: none"> <li>Hemólise microangiopática;</li> <li>Isquemia;</li> <li>Enfarte renal, pulmonar, etc;</li> <li>Coagulação intravascular disseminada com deposição de fibrina na microcirculação.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Activadores de FX e protrombina.</li> </ul>	<i>D. russelii</i> ; <i>Bothrops ssp.</i> ; <i>Echis sp.</i> ; <i>O. scutellatus</i> .

Um outro cenário possível são os acidentes por serpentes exóticas em cativeiro. Este último representa um especial desafio para o corpo clínico, pois poucos médicos são treinados em como tratar tais envenenamentos. Para ajudar em tais situações o site “*Clinical Toxinology Resources Website*” ([www.toxinology.com](http://www.toxinology.com)) contém muita informação disponível e útil.

## **Tratamento**

---

O período de tempo médio entre a admissão no hospital e o acidente é um factor determinante no que respeita à intensidade e progressão dos efeitos. De facto, para um bom prognóstico, o tratamento deve ser realizado o mais breve possível, não devendo ultrapassar as 6 horas (Oliveira *et al.*, 2010). Para minimizar os efeitos é essencial uma boa aplicação dos primeiros socorros, especialmente quando as unidades hospitalares não estão próximas. No Brasil normalmente existe um posto médico com antivenenos sempre a um raio de 3 horas de viagem, se não, o transporte aéreo pode ser requisitado. A regra básica de primeiros socorros é manter a calma de forma racional, pois a probabilidade de ocorrerem rapidamente sintomas potencialmente fatais é geralmente muito baixa, e qualquer estado de excitação e movimento podem piorar o quadro clínico. Acima de tudo, a pessoa afectada deve ser tranquilizada, sentada ou deitada e os serviços de emergência médica devem ser chamados de imediato. Se o acidente ocorrer num habitat onde várias espécies de serpentes venenosas coabitam, esta deve ser identificada ou, pelo menos, descrita para facilitar a identificação posterior (Valenta, 2010d).

Tratamento de primeiros socorros é considerado adequado quando um ou mais dos seguintes procedimentos foram realizados: limpar a área com água (com ou sem sabão), deitar o acidentado, hidratá-lo, encaminhá-lo para um hospital e trazer o animal para ser identificado<sup>10</sup>. Procedimentos inadequados: uso de torniquete, borras de café, alho, sucção e/ou cortar a área mordida, uso de objectos contaminados, dar ao acidentado bebidas alcoólicas ou chás, entre outros que normalmente advêm de crenças populares (Oliveira *et al.*, 2010).

A dose de veneno inoculada bem como a sensibilidade do individuo ao veneno conduz a diferentes quadros clínicos, como tal, o tratamento deve ser muito bem avaliado e adequado de acordo com a sintomatologia. Ter sempre em atenção a terapêutica farmacológica instituída e os efeitos biológicos do veneno porque, por exemplo, a administração de um simples analgésico que contenha ácido acetilsalicílico num doente inoculado com um veneno

---

<sup>10</sup> Para mais informações acerca do tratamento adequado para cada tipo de acidente ofídico consulte o Anexo 1.



que provoque efeitos anticoagulantes é completamente contraproducente (Valenta, 2010e, p. 63), ou o uso de opióides a um doente após possível envenenamento por serpentes do género *Elapidae* devido ao seu efeito neurotóxico.

### **Soro antiveneno e soroterapia**

Os Antivenenos antiofídicos representam o único tratamento específico capaz de neutralizar a acção dos venenos (Camey *et al.*, 2002), conseguido através da neutralização das toxinas, permitindo, no caso de toxinas hemotóxicas coagulativas, a recuperação dos factores da coagulação para um nível em que ao menor traumatismo não resulte em hemorragia (Berling & Isbister, 2015).

A primeira linha de acção na neutralização do veneno é a inibição dos componentes que quebram as barreiras do sistema hemostático (as SVMP), impedindo que outros componentes do veneno possam causar danos a nível sistémico (SVMP entre outros). No entanto, no melhor cenário, o tempo entre o acidente e a administração do antiveneno pode levar cerca de 45 minutos a 1 hora, no mínimo, e por essa altura, as SVMP já terão ‘aberto as portas’ para que outros componentes possam interferir na hemostase através dos mais variados mecanismos (Camey *et al.*, 2002; Sánchez *et al.*, 2010). Devido à importância das SVMP é crucial que os antivenenos sejam eficazes na inibição da actividade hemorrágica, proteolítica e pró-coagulante das mesmas (Moura-da-Silva & Baldo, 2012). Embora os antivenenos sejam muito eficientes em neutralizar os efeitos dos venenos botrópicos a nível sistémico, contribuem pouco a nível local (Boechat *et al.*, 2001), provavelmente devido ao efeito imediato a nível da microcirculação (Gonçalves & Chudzinski-Tavassi, 2004). Estudos em ratos mostram que os antivenenos são apenas eficazes na neutralização dos efeitos locais se administrado imediatamente após a inoculação do veneno (Boechat *et al.*, 2001).

Para a escolha do antiveneno correcto é necessário ter um bom diagnóstico clínico da possível espécie que provocou o acidente e ter em conta o grau de gravidade em que o doente se encontra para determinar a quantidade de soro necessário. Na Tabela 5 está indicado o soro apropriado para cada tipo de serpente, bem como o número de ampolas<sup>11</sup> necessárias consoante os diferentes graus de gravidade. Segundo Oliveira *et al.* (2010), de um registo de 410 doentes envenenados por mordeduras de serpentes do género *Bothrops*, foram usadas 2.514 ampolas em 408 doentes e o número médio de ampolas foram de 5,2 (+/- 2,07) para casos ligeiros, 7,5 (+/-2,55) para casos moderados e 9,8 (+/- 3,44) para casos graves, o que vai

---

<sup>11</sup> As ampolas são consideradas unidades, sendo que o volume depende do tipo de soro antiveneno usado. O número de ampolas necessárias varia consoante o tipo de acidente e a sua gravidade. Essas doses são recomendadas pelo próprio fabricante.

mais ao menos ao encontro das recomendações do instituto Butantan como se pode ver na Tabela 5.

Tabela 5 - Tratamento específico para os diferentes tipos de acidente ofídico segundo o grau de gravidade. Segundo Wen e Malaque (2013).

Acidente	Gravidade	Soro antiveneno	Nº de ampolas
<b>Botrópico</b>	Leve: edema local de até 2 segmentos*; hemorragia da pele ou mucosas; pode haver apenas distúrbios na coagulação.	Antibotrópico (SAB)	4
	Moderado: Edema que atinge 3 a 4 segmentos*; hemorragia sem comprometimento do estado geral; teste de coagulação normais ou alterados.		8
	Grave: Edema que atinge 5 segmentos*, hemorragia grave, hipotensão/choque; testes de coagulação normais ou alterados.		12
<b>Crotálico</b>	Leve: Fácies miasténica pouco evidente, sem mialgia ou urina escura; testes de coagulação normais ou alterados.	Anticrotálico (SAC)	5
	Moderado: Fácies miasténica evidente; mialgia, urina escura pouco evidente; testes de coagulação normais ou alterados.		10
	Grave: Fácies miasténica evidente, intensa mialgia, urina escura; pode haver insuficiência respiratória; testes de coagulação normais ou alterados.		20
<b>Laquético</b>	Quadro local presente; pode haver hemorragia; sem manifestações vagas.	Antibotrópico-laquético (SABL)	10
	Quadro local intenso, pode haver hemorragia; manifestações vagas presentes.		20
<b>Elapídico</b>	Considerar todos os casos potencialmente graves.	Anti-elapídico	10
*O membro atingido é dividido em 5 segmentos: por exemplo: em relação ao membro superior – 1) Mão; 2) ½ distal do antebraço; 3) ½ proximal do antebraço; 4) ½ distal do braço; 5) ½ proximal do braço. O membro inferior é dividido da mesma forma.			

Por vezes o uso de antiveneno em excesso resulta da inexperiência do corpo clínico ou da inexistência de um especialista e também pela falha no diagnóstico. A administração repetida de antiveneno está indicada se os sinais de envenenamento sistémico persistirem ou se os sintomas surgirem novamente. É necessário ter em atenção que se após administração de antiveneno os sintomas persistirem, ponderar a hipótese de que o antiveneno não foi o correcto e fazer uma nova reavaliação do diagnóstico. Os sintomas podem ressurgir no prazo de 1 a 7 dias após a administração do antiveneno, no entanto, uma sintomatologia mais ligeira pode aparecer mesmo depois de 10 a 14 dias. A recorrência dos sintomas pode dever-se a uma continuada libertação de toxinas através do local de inoculação ou a uma dissociação do complexo antigénio-antitoxina e uma rápida metabolização da antitoxina (Valenta, 2010d).

Infelizmente a administração do antiveneno e/ou de tratamento complementar não é algo que seja linear ou sempre igual, depende muito do estado clínico do doente, pois cada espécie de serpente, consoante as toxinas presentes no seu veneno, podem dar estados clínicos completamente díspares. Administração do antiveneno de forma intravenosa rápida é a causa de maior incidência de reacções anafiláticas, assim, o método mais conveniente de aplicação do antiveneno é a sua infusão intravenosa diluída, preferencialmente, em 500 ml de soro

fisiológico ou em dextrose 5% (Valenta, 2010d). De modo a prevenir choque anafilático é recomendado que todos os doentes recebam corticosteróides e/ou anti-histamínicos 15 minutos antes do uso de antiveneno (Oliveira *et al.*, 2010). Quando ocorre choque anafilático, o procedimento é o padrão com recurso a epinefrina até estabilização do doente, sendo o antiveneno posteriormente administrado de forma mais lenta e com maior supervisão (Valenta, 2010d).

Como já referido o diagnóstico específico por vezes pode ser difícil devido às diferentes espécies presentes na mesma região. Daí que os antivenenos devam ser produzidos com venenos de diferentes espécies, antecipando a neutralização do veneno da maioria das espécies do género.

A produção de antiveneno é baseada na imunização de animais de grande porte, geralmente cavalos, utilizando doses progressivas de veneno e, subsequentemente, a recolha e tratamento do soro hiperimune. Se for utilizado o veneno de uma única espécie de serpente o antiveneno obtido será monovalente ou monoespecífico. Enquanto isso, antiveneno polivalente ou poliespecífico é produzido por imunização com veneno de várias espécies de serpentes que, normalmente, envolve aqueles que habitam o território para o qual o antiveneno é projectado (Valenta, 2010b). No Brasil, a Secretaria de Vigilância Sanitária - Ministro da Saúde, através da Portaria No. 174 do Diário Oficial da União (DOU, 11 de Novembro de 1996) recomenda que a mistura de veneno de *Bothrops* a ser utilizado para produção do antiveneno polivalente comercial deve conter os venenos de *B. jararaca*, *B. alternatus*, *B. moojeni*, *B. jararacussu* e *B. neuwiedi*, de modo a aumentar o espectro de neutralização. A neutralização cruzada de venenos de espécies diferentes das utilizadas na imunização pode ocorrer devido à reactividade antigénica cruzada. Na verdade, proteínas farmacologicamente relacionadas geralmente possuem semelhanças estruturais que permitem reactividade antigénica cruzada (Moura-da-Silva, Cardoso, & Tanizaki, 1990). A variabilidade dos venenos apresenta implicações práticas na produção e controle dos antivenenos e tendo em conta que a idade e a variabilidade geográfica são conhecidas por conferir variabilidade aos venenos, é recomendável que os antivenenos, na medida do possível, sejam produzidos em cada país, usando serpentes de várias idades e de várias regiões para a produção do antiveneno (Bezerra, 2000; Camey *et al.*, 2002).

A *Bothrops erythromelas*, como já referido, é responsável pela maioria dos acidentes ofídicos no Nordeste do Brasil no entanto o seu veneno não está incluído no *pool* para a produção do antiveneno antibotrópico (Boechat *et al.*, 2001). Vários estudos apontam que o antiveneno comercial fornecido pelo Ministério da Saúde tem uma fraca imunização contra o veneno

desta serpente (Bezerra, 2000; Boechat *et al.*, 2001; Luna *et al.*, 2010). Segundo Zappellini (1991) “as alterações na coagulação somente foram revertidas com o uso de soro antibotrópico, no entanto em proporção 30 vezes superior àquela recomendada pelo Instituto Butantan”.

Nem todas as proteínas dos venenos são tóxicas, contudo outras são altamente tóxicas, mas de baixa massa molecular, consequentemente, com baixa capacidade imunogénica. Por conseguinte, a dose eficaz para que haja uma boa neutralização é prejudicada pela presença de anticorpos redundantes para moléculas que não são tóxicas e uma falta de anticorpos neutralizantes para potentes toxinas de baixa massa molecular. O antiveneno comercial, apesar de fraca imunização contra alguns dos constituintes do veneno de *B. erythromelas*, mantém-se eficaz, embora em grandes doses, aumentando assim o risco de efeitos secundários resultantes da soroterapia.

A este respeito, um conhecimento profundo da composição do veneno, da sua ontogenia, da variabilidade individual e geográfica e da venómica pode ter um efeito positivo sobre o tratamento das vítimas e na selecção de amostras para a produção de antivenenos melhorados. Assim, além de implicações ecológicas e taxonómicas, um importante objectivo da venómica é obter uma visão mais profunda sobre o espectro das toxinas clinicamente importantes de modo a compreender os mecanismos moleculares e as forças evolutivas que fundamentam a variação do veneno, para descobrir pistas a fim de melhorar a eficácia médica dos antivenenos (Calvete, 2010).

### **Cascata da coagulação**

---

A hemostase é um processo muito complexo no qual a cascata da coagulação impede a progressão de uma hemorragia em curso e mantém a integridade vascular. Esta envolve não só a formação de coágulos, mas também a sua lise (Lu *et al.*, 2005; Spronk *et al.*, 2014). Apesar de processos opostos, encontram-se em constante equilíbrio, mantendo-se as propriedades hemodinâmicas. A interligação de sistemas que mantêm essas propriedades são: o sistema pró-coagulante, o anticoagulante, o fibrinolítico e o plaquetário. A disfunção de um ou mais destes sistemas pode conduzir a estados hemorrágicos ou trombóticos (Esmon, 2014). Em condições fisiológicas, a coagulação é iniciada por uma lesão vascular, conduzindo a uma vasoconstrição reflexa na zona afectada, a mudanças na superfície endotelial e à libertação local de factores pró-coagulantes (Lu *et al.*, 2005). O plasma contém um conjunto de proteínas solúveis que actuam em conjunto numa cascata de eventos de activação de enzimas e cofactores, culminando na formação de um coágulo de fibrina (S. A. Smith, Travers, &

Morrissey, 2015). De forma a garantir a normal circulação sanguínea, o endotélio serve como superfície anticoagulante, para evitar a formação indevida de coágulos que possam vir a obstruir o fluxo sanguíneo. Assim, um endotélio normal contém antiagregantes plaquetários, anticoagulantes e factores pró-fibrinolíticos (Jackson & Nemerson, 1980).

Em organismos superiores existem dois mecanismos principais para cessar a perda de sangue na sequência de uma lesão vascular (Davie, Fujikawa, & Kiesel, 1991) a hemostase primária e a hemostase secundária.

### **Hemostase primária**

É um fenómeno auto amplificado mas localizado que se desenrola em duas fases:

- Fase vascular, que consiste na contracção do vaso promovendo a diminuição do fluxo sanguíneo.
- Fase plaquetária - Inicialmente, a activação das plaquetas leva à sua adesão no local da lesão, agregando-se para formar um tampão plaquetário, sendo o primeiro mecanismo na redução ou impedimento temporário da hemorragia daí que se chame a este processo ‘hemostase primária’. A adesão e activação das plaquetas, que ocorre no endotélio vascular lesionado, promove a libertação de numerosas proteínas e pequenas moléculas que aceleram e aumentam a formação do tampão plaquetário bem como o início da reparação tecidual (Davie *et al.*, 1991). Isto envolve, inicialmente, interacções entre as glicoproteínas da membrana plaquetária, principalmente glicoproteínas Ib (GPIb) e VI (GPVI) e o complexo glicoproteico Ia/integrina IIa (GPIa/IIa), com proteínas do subendotélio como o factor de von Willebrand (FvW), colagénio, fibronectina e vitronectina. A activação das plaquetas é então iniciada por agonistas solúveis, tais como o ácido araquidónico, o difosfato de adenosina e a trombina (Braud, Bon, & Wisner, 2000; Puy *et al.*, 2015). A trombina activa as plaquetas irreversivelmente através de uma família de receptores transmembranares da superfície das plaquetas chamados receptores activados por proteases (Luan, Zai, & Varner, 2007). Este processo envolve vias metabólicas das plaquetas e está associado com a desgranulação, em particular, do difosfato de adenosina e da serotonina. A desgranulação promove a quimiotaxia das plaquetas em circulação para o local de lesão vascular. A agregação plaquetária continua através de interacções plaqueta/plaqueta com a associação do complexo glicoproteico plaquetário IIb/integrina IIIa (GPIIb/IIIa) com fibrinogénio e o FvW (Braud *et al.*, 2000; Puy *et al.*, 2015). Estas reacções definem o início da cascata da coagulação disponibilizando fosfolípidos de carga negativa, como a fosfatidilserina sobre a superfície das plaquetas activadas ou membranas celulares danificadas (evento essencial para a

coagulação sanguínea). Uma série de reacções são então desencadeadas para reforçar o tampão plaquetário, culminando na formação de um coágulo de fibrina insolúvel (Davie *et al.*, 1991).

No que diz respeito à coagulação sanguínea, as reacções que nela ocorrem são elaboradas pela formação de complexos enzimáticos constituídos por serina endopeptidases dependentes de vitamina K e uma proteína cofactor não enzimática na superfície da membrana danificada de um modo dependente de cálcio. A ausência de um cofactor ou local de ligação é tão significativa quanto a ausência da serina endopeptidase. Da mesma forma, o cálcio, de carga positiva, é também um componente essencial para a formação do complexo de forma eficiente, fazendo a ponte entre os domínios catalíticos dos factores e os fosfolípidos, ambos de carga negativa (Butenas & Mann, 2002; Gopalakrishnakone *et al.*, 2015; Jackson & Nemerson, 1980).

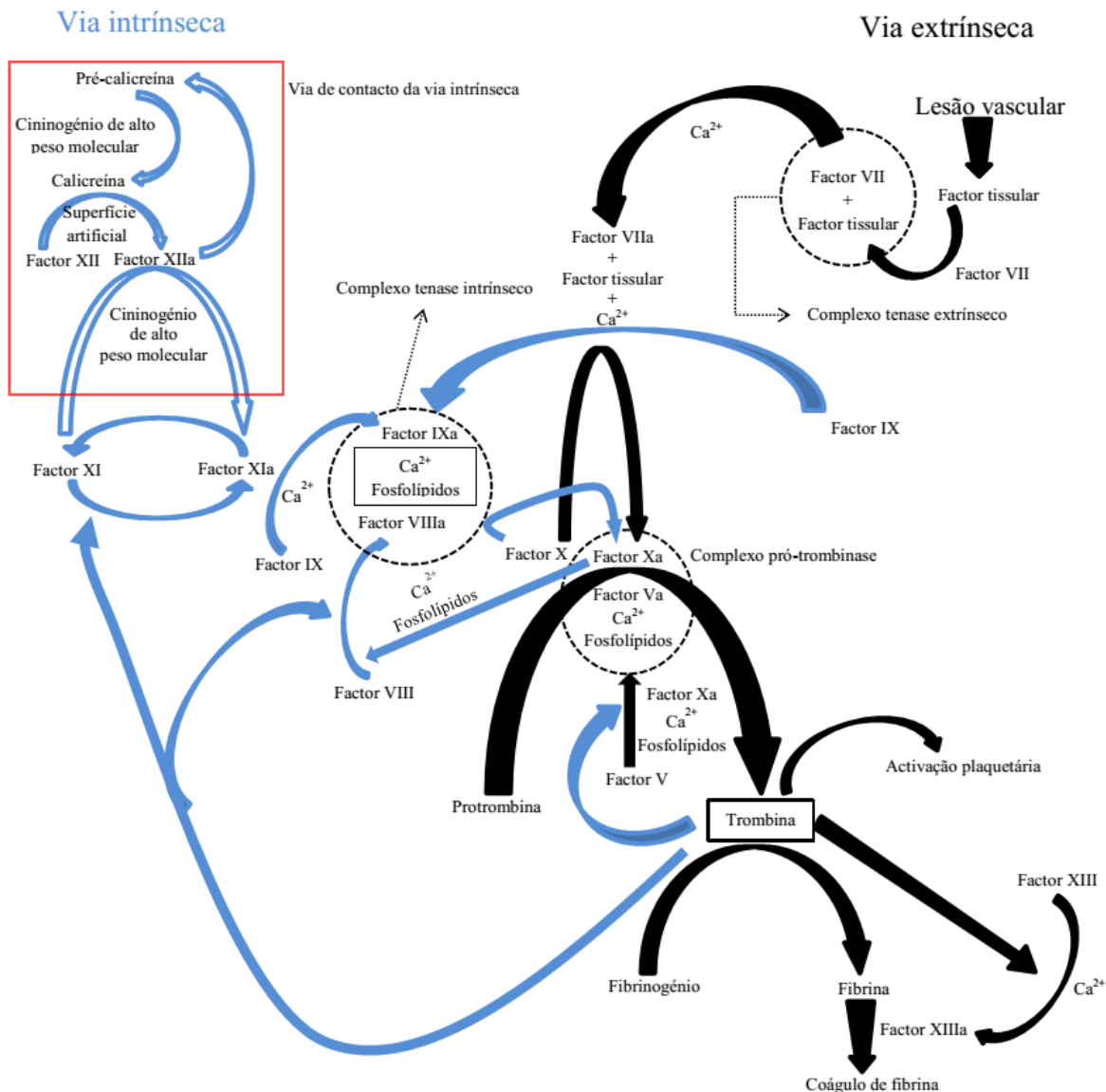
### **Hemostase secundária**

Surge na sequência de interacções entre as plaquetas e a parede vascular levando, aquando da activação dos factores de coagulação, à formação de um coágulo de fibrina insolúvel. A cascata da coagulação compreende duas vias distintas, contudo, complementares e interligadas, no qual culminam na coagulação sanguínea. A via extrínseca ou via do factor tissular (FT) e a via intrínseca ou de contacto são as vias pela qual se dá a coagulação sanguínea. A cascata da coagulação é composta por uma série de reacções que envolvem a activação de zimogénios (precursores inertes das enzimas) através de proteólise específica e limitada. A cascata pode ser observada na Figura 8, que sendo um processo complexo a sua ilustração também não poderia deixar de o ser. As enzimas resultantes são serina endopeptidases cataliticamente activas, ainda que com baixa actividade enzimática como proteínas isoladas. A ligação de uma destas proteases a uma proteína cofactor específica sobre uma superfície de membrana adequada potencia significativamente a actividade enzimática. Tal como os factores, os cofactores das proteínas da cascata circularam no plasma como pro-cofactores inertes que devem ser convertidos em cofactores activos através de proteólise (S. A. Smith *et al.*, 2015).

A cascata começa com a via extrínseca (fase de iniciação), sendo crítica no início da formação de trombina e activação de vários factores (fase de amplificação) e início da formação de fibrina. A via intrínseca desempenha um papel importante na manutenção e crescimento do coágulo de fibrina (fase de propagação) (Davie *et al.*, 1991; Maureane, 2003).

A leitura dos próximos pontos pode ser acompanhada da observação da Figura 8 para um mais fácil entendimento da cascata da coagulação e dos seus processos, sendo que as setas a azul indicam a via intrínseca e a preto a via extrínseca.

Figura 8 - Cascata da coagulação.



Setas a preto - via extrínseca; setas a azul - via intrínseca; limitado a vermelho - via de contacto da via intrínseca; limitados por um círculo preto a tracejado - complexos que se formam durante a cascata. A trombina está limitada apenas por questões práticas.

- **Via extrínseca** (setas a preto na Figura 8) inicia-se quando o plasma entra em contacto com algo externo, ou seja o FT, para que se desencadeie a coagulação (S. A. Smith *et al.*, 2015). Seja por lesão vascular (provocando uma solução de continuidade) ou por activação do endotélio, nomeadamente por agentes químicos, citoquinas ou por um processo inflamatório (Butenas & Mann, 2002). Existe constantemente em circulação 1 a 2 % de factor VII (FVII) que se encontra na sua forma activa (factor VIIa (FVIIa)) (Mann,

1999). Este quando entra em contacto com o FT na presença do cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) forma um complexo, aumentando trinta mil vezes a sua actividade catalítica (Wood, Ellery, Maroney, & Mast, 2014). O complexo entre o FT e o FVIIa (FT/VIIa) consiste em duas subunidades: a subunidade catalítica composta por uma serina endopeptidases tipo tripsina (FVIIa), e a subunidade reguladora (FT) actuando positivamente como cofactor, por alteração conformacional. O complexo FT/VIIa é um activador extremamente potente da coagulação, uma vez formado, activa dois substratos a jusante da cascata através de proteólise, o factor IX (FIX) sendo convertido em factor IXa (FIXa), e o FX convertido em FXa, através da clivagem na ligação peptídica Arg<sub>194</sub>-Ile<sub>195</sub> na cadeia pesada do FX (Davie *et al.*, 1991; Markland & Swenson, 2013). Estas enzimas activadas vão ligar-se de forma específica aos seus cofactores, a fim de propagar a cascata da coagulação. O recém-formado FXa na presença de  $\text{Ca}^{2+}$  e fosfolípidos activam o FV em factor Va (FVa). O recém-formado FVa, nas mesmas condições em que foi activado, forma um complexo com o FXa, referido como complexo pro-trombinase, em que o FVa aumenta o  $V_{\text{max}}$  em 100 vezes e os fosfolípidos, mais precisamente a fosfatidilserina da superfície das plaquetas activadas, reduz o  $K_m$  1400 vezes. Este processo acaba por conduzir a uma ínfima quantidade de trombina, a última serina endopeptidase na cascata da coagulação. A trombina recém-formada tem um potente efeito pró-coagulante, activando a montante o FV, o factor VIII (FVIII), o factor XI (FXI), o FXIII e as plaquetas, começando assim a via intrínseca da cascata da coagulação que culmina na produção mais eficiente e em maior escala de trombina por um mecanismo de *feedback* positivo. A jusante a trombina, na presença de  $\text{Ca}^{2+}$ , converte o fibrinogénio em fibrina através da proteólise dos fibrinopeptídeos A e B no N-terminal das cadeias  $\alpha$  e  $\beta$  do fibrinogénio, respectivamente. Estes monómeros de fibrina ligam-se ao domínio D do monómero de fibrina adjacente, sendo que a cadeia  $\alpha$  liga-se de forma linear e a cadeia  $\beta$  de forma paralela. Estas ligações são promovidas pelo factor XIIIa (FXIIIa) que forma ligações (glutamil)lisina entre as duas moléculas adjacentes. Inicialmente envolve as cadeias  $\gamma$  de fibrina seguido da reticulação polimérica das cadeias  $\alpha$ , formando um coágulo de fibrina insolúvel e, consequentemente, um tampão hemostático (na hemostase fisiológica) ou um trombo (na activação patológica de coagulação). O FXIIIa vai também promover reacções-cruzadas com outras proteínas plasmáticas à cadeia  $\alpha$ , como a fibronectina e a  $\alpha_2$ -antiplasmina, incorporando-as ao coágulo de fibrina (Butenas & Mann, 2002; Davie *et al.*, 1991; Gopalakrishnakone *et al.*, 2015; Koklic, Chattopadhyay, Majumder, & Lentz, 2015; Jüri Siigur & Siigur, 2010; S. A. Smith *et al.*, 2015; Wood *et al.*, 2014; Zhu *et al.*, 2015).



- **Via intrínseca** (setas a azul na Figura 8), inicia-se sem a necessidade de uma fonte de FT uma vez que todos os factores necessários estão presentes no sangue. Esta via começa com a activação da glicoproteína FXI pela trombina dando origem a factor XIa (FXIa). Esta serina endopeptidase é incomum porque contem dois centros catalíticos, por um lado activa o FXI de uma forma autocatalítica, gerando um mecanismo de *feedback* positivo; por outro lado activa o FIX em FIXa na presença de  $\text{Ca}^{2+}$ . Como foi referido acima, a trombina vai iniciar um processo de *feedback* positivo por activação dos factores V e VIII sem a necessidade de  $\text{Ca}^{2+}$  ou fosfolípidos. O FIXa juntamente com o seu cofactor FVIIIa formam o complexo tenase na presença de  $\text{Ca}^{2+}$  e fosfolípidos activando o FX em FXa. O FXa vai formar o complexo pro-trombinase, mencionado anteriormente, levando à formação de trombina, continuando assim ambas as vias num *loop* até que os mecanismos de regulação actuem de modo a que a coagulação seja limitada e controlada. Existe um factor a montante do FXI que pode levar à activação deste, o factor XII (FXII). A activação do FXII é um processo que necessita de precalicreína e cininogénio de alta massa molecular. Posteriormente o recém-formado factor XIIa (FXIIa) vai promover um *feedback* positivo para a formação de mais FXII pela activação da pré-calicreína. Contudo este factor apenas é activado para FXIIa quando o plasma entra em contacto com certos tipos de superfícies artificiais. Este processo é chamado a fase de contacto da via intrínseca e desencadeia a coagulação sanguínea apenas através da via intrínseca. A percepção de que a activação do FXI é independente do FXII ajuda a clarificar o papel do factor XI na via intrínseca. Apesar do importante papel do FXII na formação de coágulo *in vitro* e para testes laboratoriais como o APTT, a sua activação parece não ter qualquer contribuição para a hemostase *in vivo*. Esta conclusão vem do facto de que as pessoas que carecem do FXII não têm tendências hemorrágicas. Todavia, uma das funções do FXII *in vivo* parece ser a formação de bradicinina, importante mediador inflamatório (Davie *et al.*, 1991; Esmon, 2014; Gopalakrishnakone *et al.*, 2015; Mann, 1999; Puy *et al.*, 2015; S. A. Smith *et al.*, 2015).

## Regulação da cascata da coagulação

Este tópico pode ser seguido com consulta da Figura 9, de modo a facilitar o entendimento da regulação da cascata da coagulação. Sob condições fisiológicas, a coagulação é regulada por anticoagulantes endógenos e pelo sistema fibrinolítico. Uma vez formado um coágulo de fibrina na área lesionada, o processo de coagulação tem de ser restringido. Se o mecanismo de coagulação não for controlado, a coagulação pode-se propagar por toda a árvore vascular, levando a uma oclusão trombótica, mesmo após um fraco estímulo pró-coagulante. O sistema

proteína C, proteína S e trombomodulina é o mecanismo anticoagulante mais importante da regulação da coagulação através do qual a actividade pró-coagulante é confinada ao local da lesão. Durante a formação de trombina, alguma pode difundir-se pela circulação sanguínea a jusante do local da lesão, atingindo células endoteliais intactas formando uma ligação à trombomodulina que se encontram à sua superfície. O complexo trombina/trombomodulina activa a proteína C, o qual se liga ao seu cofactor proteína S, inactivando o FVa e o FVIIIa, como se pode ver na Figura 9. No entanto, o complexo proteína C activada/proteína S é muito mais eficaz na inactivação do FVa sobre a superfície de células endoteliais do que na superfície das plaquetas. Este mecanismo ajuda a limitar a formação de trombina em áreas imediatamente justapostas à da lesão. A proteína C activada pode também estimular a fibrinólise através da formação de um complexo com o inibidor do activador do plasminogénio 1 (PAI-1). O papel deste inibidor é impedir a formação de plasmina, que conduz à inibição da fibrinólise (ou dissolução de coágulo). Assim, a inibição deste inibidor da fibrinólise pela proteína C activada contraria ainda mais a coagulação (iremos abordar a fibrinólise mais à frente).

Para além destes mecanismos as células endoteliais possuem outras características anticoagulantes, tais como os inibidores de protease antitrombina III (AT-III) e inibidor da via do factor tissular (TFPI<sup>12</sup>) (Davie *et al.*, 1991; Esmon, 2014; Maureane, 2003; Perchuc & Wilmer, 2010; Tans & Rosing, 2001).

A AT-III é de particular importância pois consegue inibir a trombina (estando mais susceptível quando ligada à trombomodulina), o FIXa, o FXa, o FXIa, o FXIIa e a calicreína plasmática, como é possível observar na Figura 9. Esta inibição é lenta e progressiva, consequentemente, as serina endopeptidases da cascata terão oportunidade para gerar fibrina antes de serem inactivadas.

---

<sup>12</sup> TFPI do inglês *Tissue Factor Pathway Inhibitor*

O diagrama ilustra a cascata de coagulação sanguínea, dividida em duas vias principais: a **Via intrínseca** e a **Via extrínseca**.

**Via intrínseca:** Começa com a **Via de contacto da via intrínseca**, envolvendo o **Factor XII**, **Factor XI** e **Factor IX**. O **Factor XII** é convertido em **Factor XIIa** na **Superfície artificial**. O **Factor XI** é convertido em **Factor XIa** pelo **Factor XIIa**. O **Factor IX** é convertido em **Factor IXa** pelo **Factor XIa**. O **Factor IXa** forma o **Complexo tenase intrínseco** com o **Factor VIIIa** e **Fosfolípidos**. Este complexo ativa o **Factor X** em **Factor Xa**.

**Via extrínseca:** Começa com a **Lesão vascular**, que libera o **Factor tissular**. O **Factor VII** se liga ao **Factor tissular** na presença de  $Ca^{2+}$  e **FXa** (ativado por **Ca<sup>2+</sup> + FXa**), formando o **Complexo tenase extrínseco**. Este complexo ativa o **Factor VII** em **Factor VIIa**, que então ativa o **Factor X** em **Factor Xa**.

**Convergência e Formação de Fibrina:** O **Factor Xa** forma o **Complexo pró-trombina** com o **Factor Va** e **Fosfolípidos**. Este complexo, juntamente com o **Factor V** e **Fosfolípidos**, converte a **Protrombina** em **Trombina**. A **Trombina** converte o **Fibrinogénio** em **Fibrina**. A **Fibrina** se polimeriza para formar o **Coágulo de fibrina**. A **Trombina** também ativa o **Factor XIII** em **Factor XIIIa**, que estabiliza o coágulo.

**Regulação e Inibição:** A **Trombina** é regulada por **Antitrombina III** e **Serpinas inibidoras**. A **Trombina** também ativa a **Proteína C** em **Proteína C activada**, que inibe o **Factor Va** e o **Factor VIIIa**. A **Trombina** também ativa a **Proteína S** em **Proteína S activada**, que inibe o **Factor Va** e o **Factor VIIIa**. A **Trombina** também ativa a **Proteína C** em **Proteína C activada**, que inibe o **Factor Va** e o **Factor VIIIa**.

**Ativação de Fatores de Coagulação:** O **Factor Xa** ativa o **Factor V** em **Factor Va**. O **Factor Xa** também ativa o **Factor VIII** em **Factor VIIIa**. O **Factor Xa** também ativa o **Factor IX** em **Factor IXa**.

**Ativação de Fatores de Coagulação:** O **Factor Xa** ativa o **Factor V** em **Factor Va**. O **Factor Xa** também ativa o **Factor VIII** em **Factor VIIIa**. O **Factor Xa** também ativa o **Factor IX** em **Factor IXa**.

**Ativação de Fatores de Coagulação:** O **Factor Xa** ativa o **Factor V** em **Factor Va**. O **Factor Xa** também ativa o **Factor VIII** em **Factor VIIIa**. O **Factor Xa** também ativa o **Factor IX** em **Factor IXa**.

**Ativação de Fatores de Coagulação:** O **Factor Xa** ativa o **Factor V** em **Factor Va**. O **Factor Xa** também ativa o **Factor VIII** em **Factor VIIIa**. O **Factor Xa** também ativa o **Factor IX** em **Factor IXa**.

**Ativação de Fatores de Coagulação:** O **Factor Xa** ativa o **Factor V** em **Factor Va**. O **Factor Xa** também ativa o **Factor VIII** em **Factor VIIIa**. O **Factor Xa** também ativa o **Factor IX** em **Factor IXa**.

**Ativação de Fatores de Coagulação:** O **Factor Xa** ativa o **Factor V** em **Factor Va**. O **Factor Xa** também ativa o **Factor VIII** em **Factor VIIIa**. O **Factor Xa** também ativa o **Factor IX** em **Factor IXa**.

**Ativação de Fatores de Coagulação:** O **Factor Xa** ativa o **Factor V** em **Factor Va**. O **Factor Xa** também ativa o **Factor VIII** em **Factor VIIIa**. O **Factor Xa** também ativa o **Factor IX** em **Factor IXa**.

**Ativação de Fatores de Coagulação:** O **Factor Xa** ativa o **Factor V** em **Factor Va**. O **Factor Xa** também ativa o **Factor VIII** em **Factor VIIIa**. O **Factor Xa** também ativa o **Factor IX** em **Factor IXa**.

**Ativação de Fatores de Coagulação:** O **Factor Xa** ativa o **Factor V** em **Factor Va**. O **Factor Xa** também ativa o **Factor VIII** em **Factor VIIIa**. O **Factor Xa** também ativa o **Factor IX** em **Factor IXa**.

**Ativação de Fatores de Coagulação:** O **Factor Xa** ativa o **Factor V** em **Factor Va**. O **Factor Xa** também ativa o **Factor VIII** em **Factor VIIIa**. O **Factor Xa** também ativa o **Factor IX** em **Factor IXa**.

**Ativação de Fatores de Coagulação:** O **Factor Xa** ativa o **Factor V** em **Factor Va**. O **Factor Xa** também ativa o **Factor VIII** em **Factor VIIIa**. O **Factor Xa** também ativa o **Factor IX** em **Factor IXa**.

**Ativação de Fatores de Coagulação:** O **Factor Xa** ativa o **Factor V** em **Factor Va**. O **Factor Xa** também ativa o **Factor VIII** em **Factor VIIIa**. O **Factor Xa** também ativa o **Factor IX** em **Factor IXa**.

**Ativação de Fatores de Coagulação:** O **Factor Xa** ativa o **Factor V** em **Factor Va**. O **Factor Xa** também ativa o **Factor VIII** em **Factor VIIIa**. O **Factor Xa** também ativa o **Factor IX** em **Factor IXa**.

**Ativação de Fatores de Coagulação:** O **Factor Xa** ativa o **Factor V** em **Factor Va**. O **Factor Xa** também ativa o **Factor VIII** em **Factor VIIIa**. O **Factor Xa** também ativa o **Factor IX** em **Factor IXa**.

**Ativação de Fatores de Coagulação:** O **Factor Xa** ativa o **Factor V** em **Factor Va**. O **Factor Xa** também ativa o **Factor VIII** em **Factor VIIIa**. O **Factor Xa** também ativa o **Factor IX** em **Factor IXa**.

**Ativação de Fatores de Coagulação:** O **Factor Xa** ativa o **Factor V** em **Factor Va**. O **Factor Xa** também ativa o **Factor VIII** em **Factor VIIIa**. O **Factor Xa** também ativa o **Factor IX** em **Factor IXa**.

**Ativação de Fatores de Coagulação:** O **Factor Xa** ativa o **Factor V** em **Factor Va**. O **Factor Xa** também ativa o **Factor VIII** em **Factor VIIIa**. O **Factor Xa** também ativa o **Factor IX** em **Factor IXa**.

**Ativação de Fatores de Coagulação:** O **Factor Xa** ativa o **Factor V** em **Factor Va**. O **Factor Xa** também ativa o **Factor VIII** em **Factor VIIIa**. O **Factor Xa** também ativa o **Factor IX** em **Factor IXa**.

**Ativação de Fatores de Coagulação:** O **Factor Xa** ativa o **Factor V** em **Factor Va**. O **Factor Xa** também ativa o **Factor VIII** em **Factor VIIIa**. O **Factor Xa** também ativa o **Factor IX** em **Factor IXa**.

**Ativação de Fatores de Coagulação:** O **Factor Xa** ativa o **Factor V** em **Factor Va**. O **Factor Xa** também ativa o **Factor VIII** em **Factor VIIIa**. O **Factor Xa** também ativa o **Factor IX** em **Factor IXa**.

**Ativação de Fatores de Coagulação:** O **Factor Xa** ativa o **Factor V** em **Factor Va**. O **Factor Xa** também ativa o **Factor VIII** em **Factor VIIIa**. O **Factor Xa** também ativa o **Factor IX** em **Factor IXa**.

**Ativação de Fatores de Coagulação:** O **Factor Xa** ativa o **Factor V** em **Factor Va**. O **Factor Xa** também ativa o **Factor VIII** em **Factor VIIIa**. O **Factor Xa** também ativa o **Factor IX** em **Factor IXa**.

**Ativação de Fatores de Coagulação:** O **Factor Xa** ativa o **Factor V** em **Factor Va**. O **Factor Xa** também ativa o **Factor VIII** em **Factor VIIIa**. O **Factor Xa** também ativa o **Factor IX** em **Factor IXa**.

**Ativação de Fatores de Coagulação:** O **Factor Xa** ativa o **Factor V** em **Factor Va**. O **Factor Xa** também ativa o **Factor VIII** em **Factor VIIIa**. O **Factor Xa** também ativa o **Factor IX** em **Factor IXa**.

**Ativação de Fatores de Coagulação:** O **Factor Xa** ativa o **Factor V** em **Factor Va**. O **Factor Xa** também ativa o **Factor VIII** em **Factor VIIIa**. O **Factor Xa** também ativa o **Factor IX** em **Factor IXa**.

**Ativação de Fatores de Coagulação:** O **Factor Xa** ativa o **Factor V** em **Factor Va**. O **Factor Xa** também ativa o **Factor VIII** em **Factor VIIIa**. O **Factor Xa** também ativa o **Factor IX** em **Factor IXa**.

**Ativação de Fatores de Coagulação:** O **Factor Xa** ativa o **Factor V** em **Factor Va**. O **Factor Xa** também ativa o **Factor VIII** em **Factor VIIIa**. O **Factor Xa** também ativa o **Factor IX** em **Factor IXa**.

**Ativação de Fatores de Coagulação:** O **Factor Xa** ativa o **Factor V** em **Factor Va**. O **Factor Xa</**

36

Na presença de heparina ou de glicosaminoglicanos sulfatados, a reacção da AT-III sob as serina endopeptidases é virtualmente instantânea.

O inibidor da C1 esterase é um inibidor de proteases do plasma, sendo o fundamental regulador da via intrínseca, inibindo o FXIIa, a calicreína, e o FXIa, bem como vários membros da cascata do sistema complemento (Davie *et al.*, 1991; Esmon, 2014; Luan *et al.*, 2007; Zappellini, 1991).

O TFPI é produzido pelas células endoteliais e pelas plaquetas, porém também pode ser encontrada em monócitos e em circulação no plasma, e interage com o complexo FT/FVIIa impedindo a activação do FX, contudo não bloqueia a activação do FIX pelo mesmo complexo. Assim, a activação do FX pode continuar, em parte, embora na presença de TFPI, através da via intrínseca pelo FIXa. À medida que a via extrínseca é inibida pelo TFPI, é provável que a via intrínseca se torne a principal via para o crescimento do coágulo de fibrina. O TFPI é também capaz de se ligar ao FXa mas esta ligação é reversível e dependente de  $\text{Ca}^{2+}$ , enquanto que a ligação ao complexo TF/VIIa é irreversível, requerendo  $\text{Ca}^{2+}$  e FXa, como se pode ver na Figura 9 (Broze & Girard, 2012; Davie *et al.*, 1991; Esmon, 2014; Marlu & Polack, 2012; Maureane, 2003; Puy *et al.*, 2015).

A proteína C activada é uma glicoproteína plasmática, dependente de vitamina K, e é extremamente importante na regulação da coagulação sanguínea. Quando estimulada pela proteína S inactiva, tanto o FVa quanto o FVIIIa na presença de  $\text{Ca}^{2+}$  e de fosfolípidos. A proteína C também circula no sangue sob a forma de zimogénio e é convertida para a sua forma activa pela trombina na presença de um cofactor ligado à membrana, a trombomodulina. Esta proteína também está sujeita a inibidores incluindo o inibidor da proteína C, a  $\alpha_2$ -macroglobulina e a  $\alpha_1$ -antitripsina (Cheng, Wu, Shi, & Tsai, 2012; Davie *et al.*, 1991; Esmon, 2000; Markland, 1997).

A trombomodulina é uma glicoproteína de cadeia única localizada na superfície das células endoteliais. Esta forma um complexo com a trombina e altera a especificidade da enzima relativamente ao seu substrato. Surpreendentemente, a trombina, que formou um complexo com a trombomodulina passa a activar a proteína C, enquanto perde a sua capacidade de activar plaquetas, bem como a sua actividade proteolítica para outros substratos tais como o fibrinogénio ou o FV. Assim, a trombina alterou a sua função de pró-coagulante para anticoagulante através da interacção com a trombomodulina. A importância desta via é enfatizada pelo facto de que indivíduos sem proteína C ou proteína S têm frequentemente complicações trombóticas (Davie *et al.*, 1991).

Segundo Davie *et al.* (1991) e S. Smith (2011) outros inibidores que podem desempenhar um papel significativo na regulação da coagulação são:

- O cofactor II da heparina que inibe a trombina;
- A  $\alpha_2$ -macroglobulina que inibe várias proteases das quais se destacam a calicreína, a trombina e a plasmina;
- A  $\alpha_1$ -antitripsina inibe além da tripsina, a plasmina, o FXIa e o XIIa.

Após a paragem da hemorragia e a restauração do endotélio tiver sido feita por uma série de divisões celulares, o sistema fibrinolítico é então activado dissolvendo gradualmente o coágulo em 60 a 72 horas após a formação deste. Esta actividade lítica é devida principalmente a uma serina endopeptidase, a plasmina, cuja função é a degradação da malha de fibrina. A plasmina é produzida pela activação do plasminogénio, sendo catalisada pelo activador do plasminogénio tissular na presença de fibrina recém-formada e pela uroquinase. A formação e o *turnover* lento da fibrina são importantes, para que a regeneração e remodelação dos tecidos ocorra (Braud *et al.*, 2000; Davie *et al.*, 1991; Esmon, 2014; Gopalakrishnakone *et al.*, 2015; Maureane, 2003).

Os inibidores da fibrinólise são a  $\alpha_2$ -antiplasmina, o inibidor do activador do plasminogénio e o inibidor da fibrinólise activado pela trombina (McConnell, 2000).

No que diz respeito aos factores da coagulação, só irá ser abordado de forma mais profunda o FX pela natureza do trabalho efectuado. Os restantes factores da coagulação podem ser consultados no Anexo 2.

## **FX**

O factor X (factor de Stuart-Prower) é uma glicoproteína de domínios múltiplos, principalmente sintetizado no fígado e posteriormente secretado para o sangue sob a forma de zimogénio da serina endopeptidase FXa (Jüri Siigur & Siigur, 2010). É sintetizado como uma cadeia polipeptídica simples com 488 aminoácidos (Tans & Rosing, 2001) em que a cadeia leve (17,5 KDa) e a pesada (45 KDa) estão ligadas por um tripéptido de Arg-Lys-Arg. A molécula de cadeia simples é em seguida clivada para formar as cadeias leves e pesadas, por clivagem de duas (ou mais) ligações peptídicas internas, ficando estas duas cadeias ligadas entre si por uma ligação dissulfeto (Jüri Siigur & Siigur, 2010). A cadeia leve contém 11 resíduos de ácido  $\gamma$ -carboxiglutâmico (Gla) que são o resultado de carboxilação pós-translacional de resíduos específicos do ácido glutâmico na extremidade N-terminal do domínio Gla (Tans & Rosing, 2001). Fisiologicamente, o  $\text{Ca}^{2+}$  induz as alterações

conformacionais no domínio Gla que permite a ligação do FX às membranas de carga negativa e exercer a sua função pró-coagulante (Alvarez-Flores *et al.*, 2011). A cadeia pesada do FX contém a tríade catalítica Ser<sub>195</sub>-His<sub>57</sub>-Asp<sub>102</sub>, típico das serina endopeptidases. A activação do FX é feita pela clivagem de uma única ligação peptídica Arg<sub>194</sub>-Ile<sub>195</sub> no qual são removidos os primeiros 52 resíduos do N-terminal da cadeia pesada, expondo o sítio activo da molécula (S. Takeda, Igarashi, & Mori, 2007; Tans & Rosing, 2001).

O FX é um dos cinco factores dependentes de vitamina K, sendo que os restantes são a protrombina, o FVII, o FIX e a proteína C (Lee, Zhang, Wang, Xiong, & Gao, 1995). Todas as serina endopeptidases dependentes da vitamina K são compostas por um número diferente de domínios funcionais. Por exemplo, o FX contém um péptido sinal (essencial para a secreção), um pró-péptido, a região N-terminal (domínio Gla) que contém os resíduos de ácido  $\gamma$ -carboxiglutâmico necessários para a ligação ao  $\text{Ca}^{2+}$  (cuja formação é induzida pela vitamina K), dois domínios que partilham homologia com o factor de crescimento epidérmico, um péptido de activação e o domínio catalítico (proteolítico). O FX contém dois locais de ligação com elevada afinidade para o  $\text{Ca}^{2+}$ , o domínio Gla e o primeiro domínio do factor de crescimento epidérmico, que inclui um resíduo de ácido  $\beta$ -hidroxiaspártico (Jüri Siigur & Siigur, 2010).

O FX desempenha um papel crucial na coagulação sanguínea. A sua activação é o ponto de convergência entre as vias intrínseca e extrínseca e é o único activador fisiológico conhecido da protrombina (Lee *et al.*, 1995). A falta deste factor conduz a uma síndrome hemorrágica conhecida como “deficiência do factor Stuart-Prower” (E. Siigur *et al.*, 2001). Para além destas duas vias pode também ser activado pela tripsina e por alguns tipos de veneno de serpente (Lee *et al.*, 1995).

### **Cascata da coagulação e os venenos**

Ao longo da evolução das diferentes espécies de animais venenosos, cada um desenvolveu o seu próprio ‘cocktail’ de toxinas, visto que as suas presas podem ser de variadas espécies (Santoro & Sano-Martins, 1993). Assim, existem toxinas que podem afectar qualquer factor da cascata da coagulação, interferindo assim com a hemostase a vários níveis, como é possível observar na Figura 9 (setas a verde) (Kini, 2011; Sánchez *et al.*, 2010; White, 2005). Contudo, com vista à necessidade das serpentes rapidamente imobilizarem as suas presas, não é de surpreender que as principais actividades pró-coagulantes atinjam factores já no fim da cascata (como o FX e a protrombina), onde a coagulação possa ser induzida em segundos (Hutton & Warrell, 1993).

## Activadores de FX nos venenos

Embora esteja relatada a existência de activadores de FX nos venenos de várias espécies de serpentes, apenas um número limitado foi isolado e caracterizado. Na sua maioria são metaloproteases provenientes de serpentes da família *Viperidae* e subfamília *Crotalidae*. Alguns activadores de FX foram descritos em *Elapidae* como sendo serina endopeptidases (Chudzinski-Tavassi *et al.*, 2014; Lee *et al.*, 1995).

O activador de FX, melhor caracterizado, conhecido e importante foi isolado do veneno da *Daboia russelii* (família *Viperidae*) em 1961 (Markland & Swenson, 2013), comercialmente chamado RVV-X, como já referido. Existe também um outro activador de FX bem estudado até ao momento, isolado da *Macropiviera lebetina*, o VLFXA<sup>13</sup> (Jüri Siigur & Siigur, 2010).

O RVV-X é uma glicoproteína da família das metaloproteases da classe P-IIIId (pertencendo anteriormente à classe P-IV) (Fox & Serrano, 2008), com cadeia tripla ligada por pontes de dissulfeto. É composta por uma cadeia pesada de 58 kDa, constituída pelos domínios metaloprotease, tipo desintegrina e ricos em cisteína; e por duas cadeias leves de 19,4 kDa e 16,4 kDa. As cadeias leves são lectinas do tipo C, o qual é proposto que seja, a partir destas, que haja o reconhecimento e ligação ao domínio Gla do FX, numa forma dependente de  $\text{Ca}^{2+}$ . O  $\text{Ca}^{2+}$  desempenha um papel muito importante, pois provoca uma alteração conformacional, no domínio Gla, de modo a que possa ser reconhecido pelo RVV-X. Após ligação ao domínio Gla a cadeia pesada do RVV-X cliva o FX na ligação peptídica Arg<sub>194</sub>-Ile<sub>195</sub>, sendo o mesmo ponto de clivagem de uma situação fisiológica (Alvarez-Flores *et al.*, 2011; Chudzinski-Tavassi *et al.*, 2014; Gowda, Jackson, Kurzban, McPhie, & Davidson, 1996; Lu *et al.*, 2005; Yamada, Sekiya, & Morita, 1997). Outros activadores de FX da família das SVMPs têm estruturas semelhantes ao RVV-X e mecanismos catalíticos provavelmente semelhantes. O RVV-X também tem a capacidade de activar o FIX (Chudzinski-Tavassi *et al.*, 2014; Lu *et al.*, 2005).

O RVV-X é um exemplo de uma toxina que evoluiu para atingir proteínas específicas na cascata da coagulação, quando atinge uma presa causa efeitos deletérios instantaneamente evidenciado pela imediata coagulação sanguínea (Doley & Kini, 2009). Tem sido uma ferramenta extremamente útil na investigação trombótica, no estudo da cascata da coagulação, como ferramentas de diagnóstico e como reagente em investigação científica (Chen, Chen, Lin, Khoo, & Tsai, 2008).

---

<sup>13</sup> VLFXA do inglês *Vipera lebetina factor X activator*

## Metaloproteases

---

Como anteriormente referido, os venenos de serpentes são uma mistura complexa de proteínas e polipéptidos bioactivos que contribuem para subjugar, matar e/ou digerir a presa. As proteases isoladas até agora a partir de venenos de serpentes são estruturalmente classificados em dois grupos:

- As metaloproteases (SVMPs) que necessitam de  $\text{Ca}^{2+}$  e/ou  $\text{Zn}^{2+}$  para a sua actividade hidrolítica sendo inibidas por agentes quelantes de metais como o EDTA<sup>14</sup> (Gopalakrishnakone *et al.*, 2015). Temos como proteases pertencentes a este grupo os activadores de FX, de protrombina, de  $\alpha(\beta)$ -fibrinogénases, proteases hemorrágicas e proteases indutoras de apoptose;
- Relativamente ao grupo das serina endopeptidases tipo tripsina as proteases pertencentes são os activadores de FV, de proteína C, de plasminogénio, de enzimas tipo trombina e enzimas libertadoras de cininas,  $\alpha(\beta)$ -fibrinogénases e alguns activadores de FX e de protrombina (J. Siigur *et al.*, 2005; S. Takeda, Takeya, & Iwanaga, 2012).

As SVMPs estão amplamente distribuídas por todas as famílias de serpentes venenosas, nomeadamente, na família *Viperidae*, contudo, em proporções menores, também se encontram nas famílias *Colubridae* e *Elapidae* (Schattner *et al.*, 2005). Análises proteómicas mostram que as SVMPs são componentes maioritários nos venenos de serpentes da família *Viperidae*, com percentagens entre os 11% e os 65% da proteína total, sendo dos principais factores que contribuem para a toxicidade da subfamília *Crotalidae*, que se destacam pela sua grande capacidade hemorrágica (Markland & Swenson, 2013; Öhler *et al.*, 2010).

O isolamento de SVMPs foi feito pela primeira vez por investigadores japoneses no início de 1960 (Markland & Swenson, 2013), contudo foram os primeiros estudos de J. W. Fox e Bjarnason (1994) que levaram à classificação das SVMPs bem como a percepção da existência de variações estruturais representando um passo importante para a compreensão das suas formas estruturais. Estas foram subdivididas nas seguintes classes de proteínas P-I, P-II e P-III (alguns autores chegam a considerar um quarto grupo, o qual não se encontra em vigor na actual nomenclatura, colocando a classe P-III dividida em subgrupos). A principal característica que distingue as diferentes classes é o tamanho (massa molecular) e diferenças no domínio estrutural (Markland & Swenson, 2013).

---

<sup>14</sup> EDTA do inglês *Ethylenediamine tetraacetic acid*.



As SVMPs são proteases dependentes de  $Zn^{2+}$  pertencentes à superfamília das metzincinas, em conjunto com as astacinas, Serralisinas, metaloproteases de matriz (MMPs<sup>15</sup>) e metaloproteases com domínio desintegrina (ADAMs<sup>16</sup>). Por sua vez, as SVMPs, as ADAMs e as ADAMTs<sup>17</sup>, pertencem a uma subfamília de reprotisinas/adamalisinas M12B (Bode *et al.*, 1996; MEROPS, 2015; Moura-da-Silva *et al.*, 2008; Schattner *et al.*, 2005; S. Takeda *et al.*, 2012). Salvo poucas exceções, todas as SVMPs têm a mesma sequência quelante de  $Zn^{2+}$  no seu domínio catalítico, caracterizada pela sequência HEXXHXXGXXH e um Met-turn.

É amplamente aceite que a evolução precoce das SVMPs teve origem nas ADAM, como resultado da pressão adaptativa dos venenos aos diversos tipos de presas (Fox & Serrano, 2009). Esta teve por base a incorporação de genes da família ADAM, que, através de processos de duplicação e acelerada mutação génica tiveram na origem da incrível diversidade de SVMPs presentes nestes venenos. Estas enzimas desempenham papéis muito importantes na biologia das serpentes, bem como na fisiopatologia dos envenenamentos (Gutiérrez, Rucavado, & Escalante, 2009; Gutiérrez, Rucavado, Escalante, & Díaz, 2005). O facto de algumas SVMPs, nomeadamente as P-III, apresentarem alguns domínios homólogos às ADAMs tem permitido que sirvam de modelo para o estudo das funções das mesmas (Pereira, Fritzen, Faria, Motta, & Chudzinski-Tavassi, 2006).

Como referido acima, as SVMPs são classificadas em três classes de acordo com a organização dos seus domínios, como se pode ver na Figura 10.

Segundo Markland e Swenson (2013) e J. Siigur *et al.* (2005):

- A Classe I (P-I) são SVMPs de pequena dimensão com massa molecular compreendida entre os 20 e os 30 kDa e contêm apenas um domínio metaloprotease.
- A classe II (P-II) são SVMPs de dimensão média com massa molecular entre os 30 e os 60 kDa, contêm um domínio metaloprotease e um domínio tipo desintegrina. O domínio desintegrina destas SMVPs contêm uma sequência MGD substituindo a sequência RGD encontrada em muitas desintegrinas levando a que não tenha actividade inibidora da agregação plaquetária.
- A Classe III (P-III) são SVMPs de grandes dimensões com massa molecular entre os 60 e os 100 kDa que, segundo Kini (2011) contêm um domínio metaloprotease, um domínio tipo desintegrina e um domínio rico em cisteína, numa conformação estrutural em forma de C.

---

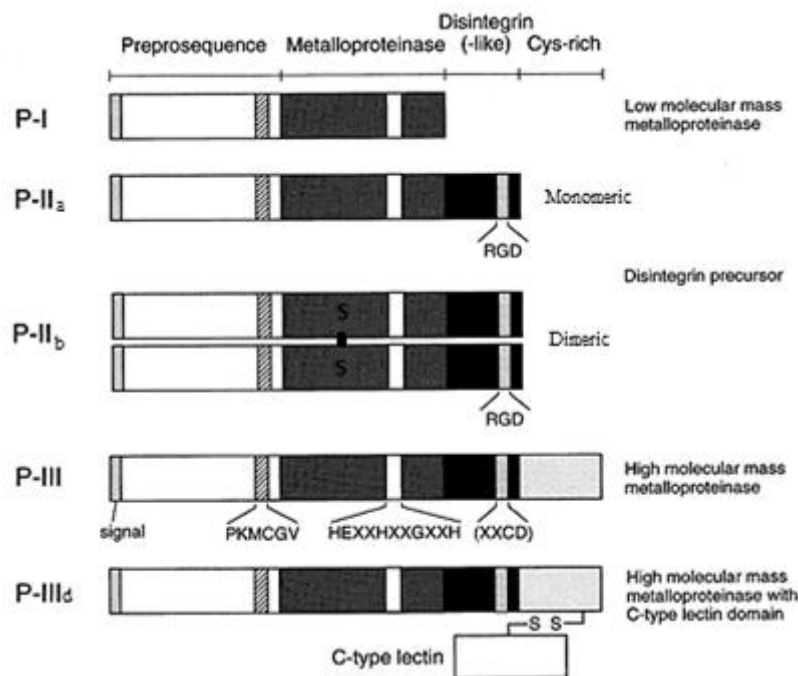
<sup>15</sup> MMP do inglês *matrix metalloproteinases*.

<sup>16</sup> ADAM do inglês *A Disintegrin And Metalloproteinase*.

<sup>17</sup> ADAM do inglês *A Disintegrin And Metalloproteinase with thrombospondin motifs*.

- A antiga classe IV (P-IV), (actual P-III<sub>d</sub>) são SVMPs com todos os domínios da P-III acrescentando um domínio tipo lectina.

Figura 10 - Estrutura esquemática dos domínios de cada classe das metaloproteases dos venenos de serpentes. Segundo Hsu e Huang (2010) e Matsui, Fujimura e Titani (2000).



Os diferentes domínios estão alinhados de forma a comparar as diferenças estruturais de cada classe.

De modo a acomodar as mais variadas estruturas observadas durante a caracterização das SVMPs, e como foi já referido, a classes P-III foi dividida com base nas suas distintas modificações pós-traducionais, tais como a dimerização (P-III<sub>c</sub>) ou processamento proteolítico (P-III<sub>b</sub>) (Fox & Serrano, 2005, 2008; Markland & Swenson, 2013). No esquema de classificação mais recente o RVV-X foi colocado na subclasse heterotrimérica P-III<sub>d</sub> (Soichi Takeda, 2010).

A diversidade das SVMPs nos venenos destaca a importância desta família de toxinas para a adaptação das serpentes do género *Bothrops*, o que traz à tona a questão do porquê dos venenos conterem um número tão grande de formas distintas de toxinas do mesmo grupo funcional/enzimático, presumivelmente com actividades semelhantes. Muitas destas serpentes têm uma abundância predominante de SVMPs da classe P-III nos seus venenos durante todo o seu ciclo de vida. Uma característica notável destas enzimas é a versatilidade que mostram perante os sistemas biológicos, sendo que esta diversidade funcional pode ser devida ao direccionamento evolutivo para capturar diferentes tipos de presas. Segundo o trabalho de

Bernardoni *et al.* (2014) a variabilidade entre os membros de uma mesma família de toxinas apresenta vantagens adaptativas para a serpente.

O isolamento das SVMPs permitiu concluir que os efeitos em determinado alvo, como a cascata da coagulação, em diferentes espécies animais são distintos, sugerindo a presença de um arsenal eficaz contra potenciais presas de espécie diferentes ou até mesmo predadores (Bernardoni *et al.*, 2014).

Para mais informações acerca dos venenos pertencentes a cada classe das SVMP e as suas actividades biológicas consulte o Anexo 3.

As SVMPs são sintetizadas na glândula de veneno a partir do mRNA sob a forma de zimogénios por bloqueio do local de ligação do  $Zn^{2+}$  através de um grupo tiol. Após secreção do veneno, o processo proteolítico converte o zimogénio para a forma activa por remoção do grupo tiol. A troca de cisteínas é o mecanismo de activação das SVMPs, assim como das MMPs de origem mamífera, em que há clivagem do domínio pró-peptídio numa região que conserva um resíduo de cisteína (Markland & Swenson, 2013; Matsui *et al.*, 2000).

Estas proteases, em especial as pertencentes à classe P-III, provocam uma panóplia de efeitos, quer locais quer sistémicos, que se seguem pós envenenamento (Bernardoni *et al.*, 2014; Moura-da-Silva & Baldo, 2012).

A nível local as SVMPs provocam hemorragia devido à degradação proteica da membrana basal em torno da parede dos vasos sanguíneos, em especial a laminina, colagénio tipo IV e entactina (Moura-da-Silva *et al.*, 2008), conduzindo à perda da integridade capilar (Markland, 1997) devido a forças biofísicas da hemodinâmica, entre outras a pressão, a resistência ao fluxo sanguíneo (Gutiérrez *et al.*, 2009), ocorrendo hemorragia *per rhexis*. Existe, no entanto, outra forma das SVMPs induzirem hemorragia em que há aumento do *gap* entre as junções intercelulares das células endoteliais. Ocorre principalmente em células endoteliais das vénulas em consequência da reacção inflamatória provocada pelas SVMPs pela indução da libertação de citocinas inflamatórias (Schattner *et al.*, 2005). Este processo ocorre sem evidentes alterações patológicas na morfologia das células endoteliais, ou seja, a hemorragia ocorre por diapedese (Gutiérrez *et al.*, 2005). A actividade inflamatória a nível local leva a edema, em que alguns casos pode ser extremamente grave, podendo levar a síndrome de compartimentalização. Certas SVMPs, contudo, não possuem actividade hemorrágica, actuam através de diferentes mecanismos a nível mais sistémico perturbando a hemostase através de efeitos pró ou anticoagulantes tais como: actividade fibrinogénica, activador de protrombina, activador de FX, inibição da agregação plaquetária, actividade pró-inflamatória, inibição dos inibidores das serina endopeptidases sanguíneas (serpinas) e ainda indutor de

apoptose (Markland & Swenson, 2013; S. Takeda *et al.*, 2012). Os efeitos inibidores das SVMP sobre a agregação plaquetária podem potenciar as lesões hemorrágicas, por não permitirem que as plaquetas se liguem ao local da lesão (Moura-da-Silva *et al.*, 2008; S. Takeda *et al.*, 2012). As SVMPs activam mediadores vasoactivos nomeadamente o TNF- $\alpha$  provocando alterações hemodinâmicas, sendo que estas substâncias vasoactivas têm sido sugeridas por se correlacionar com alterações nas funções e hemodinâmica renal (Suntravat, Yusuksawad, Sereemaspun, Perez, & Nuchprayoon, 2011), entre outros factores associados vai ao encontro dos sinais clínicos dos doentes envenenados.

Como referido acima a composição da maioria dos venenos de serpentes da família *Viperidae* são ricos em SVMPs, sugerindo o seu significativo papel na patogénese relacionado com o envenenamento, tais como hemorragia, coagulação intravascular, edema, inflamação e necrose (S. Takeda *et al.*, 2012). O tipo de domínio presente em cada toxina desenvolve um papel importante na capacidade da proteína induzir hemorragia (Fox & Bjarnason, 1994). As P-III têm uma arquitectura com vários domínios não catalíticos, todavia caracterizam-se por apresentar uma maior capacidade de induzir hemorragia entre outras actividades biológicas em comparação com as P-I que só têm um domínio catalítico (S. Takeda *et al.*, 2012). Porém existem SVMPs da classe P-III que carecem de actividade hemorrágica, contudo exercem efeitos coagulantes potentes, tais como a classe A dos activadores da protrombina, descrito pela primeira vez por (M. B. Silva *et al.*, 2003) no veneno de *B. erythromelas*.

Com referência ao mecanismo de acção das SVMPs, é de considerável interesse, após envenenamento, a presença de inibidores de proteases no sangue. Fox, Baramova, Shannon, Bjarnason e Gonias (1990) fizeram uma importante e interessante descoberta quando descreveram a interacção das SVMPs hemorrágicas com a  $\alpha_2$ -macroglobulina humana, mostrando que a classe P-I das SVMPs hemorrágicas (com cerca de 25 kDa de massa molecular) é rapidamente inactivada pela  $\alpha_2$ -macroglobulina, ao contrário das SVMPs hemorrágicas P-III (com massa molecular a rondar os 68 kDa). A  $\alpha_2$ -macroglobulina é uma inibidora de proteases não específica muito grande (720 KDa) que se encontra em circulação sanguínea. Esta inibe todas as classes de proteases, incluindo as metaloproteases, as serina endopeptidases, entre outras, por um mecanismo de armadilha envolvendo a protease formando uma ligação covalente. Contudo, proteases de maior dimensão não se encaixam na armadilha, logo não são inibidas (Markland & Swenson, 2013).

## Composição do veneno

---

Os venenos ofídicos constituem uma mistura complexa de diversos componentes que se originam a partir de uma síntese proteica altamente especializada, e que parecem actuar em perfeita sintonia, tanto na digestão da presa, como na protecção da serpente contra os seus predadores naturais (Zappellini, 1991). As proteínas são o constituinte mais abundante dos venenos ofídicos (Paes Leme *et al.*, 2009) constituindo cerca de 90% do seu peso seco. A fracção não proteica compreende iões inorgânicos, lípidos (principalmente fosfolípidos), hidratos de carbono (glicoproteínas), pequenos peptídeos, aminas biogénicas (particularmente abundantes em *Viperidae* e *Crotalidae*), nucleótidos e aminoácidos (Fox & Bjarnason, 1994; Karlsson, 1979; M. Silva, 2002). Os elementos inorgânicos dos venenos podem incluir: Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, P, Co e Zn. Nem todos estes metais estão presentes em todos os venenos sendo que a sua quantidade também é variável dependendo da espécie de serpente. A função biológica que cada metal desempenha no envenenamento não é clara, todavia, é provável que alguns deles, tais como o Ca, Mg, e Mn, sejam importantes para a estabilização proteica. Outros como o Zn, Cu, Fe e Co, podem participar de forma activa nos mecanismos catalíticos de certos componentes de algumas enzimas, tais como as metaloproteases (Fox & Bjarnason, 1994). Os hidratos de carbono parecem desempenhar um papel importante na toxicologia, não só através do aumento da solubilidade e estabilidade de glicoproteínas presentes nos venenos, mas também pela promoção do reconhecimento dos seus alvos e pela ligação específica *in vivo* (Chen *et al.*, 2008).

Os componentes maioritários dos venenos de serpentes, como já referido, são uma mistura de proteínas e polipéptidos bioactivos, sendo classificados como enzimáticos ou não-enzimáticos. Na sua maioria, existem na forma de monómeros, mas alguns deles podem formar complexos. A actividade farmacológica que estes complexos exibem é muito superior em comparação com os monómeros individualmente. Estas interacções sinérgicas entre proteínas desempenham um papel importante nos efeitos fisiopatológicos durante o envenenamento, podendo aumentar a letalidade do veneno (Doley & Kini, 2009).

Antes de referir os possíveis componentes que podemos encontrar numa serpente venenosa, não é de mais reforçar que os venenos não possuem todos a mesma composição e que o tipo de compostos presentes varia de espécie para espécie.

Normalmente, segundo estes autores (Larréché, Mion, & Goyffon, 2008; Markland (1997); Matsui *et al.*, 2000; Paes Leme *et al.*, 2009; Schattner *et al.*, 2005) as enzimas podem assumir as seguintes actividades:

- Fosfolipase A<sub>2</sub> (propriedades anticoagulantes por inactivação dos fosfolípidos essenciais para o início da cascata da coagulação (Teng, Wang, Huang, & Liao, 1989));
- Fosfodiesterase;
- Fosfomonoesterase;
- L-aminoácido-oxidase;
- Acetilcolinesterase;
- Actividade proteolítica (serina endopeptidase e SVMs);
- Esterase de arginina;
- 5'-nucleotidase;
- Hialuronidase;
- Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina;
- Factores indutores do crescimento nervoso;
- Factores indutores do crescimento vascular;
- Proteases com funções inibitórias;
- Entre outras.

Os péptidos podem compreender:

- Neurotoxinas pré e pós-sináptica;
- Interferir com os canais de potássio;
- Citotoxinas;
- Miotoxinas;
- Cardiotoxinas;
- Inibidores da agregação plaquetária (disintegrinas);
- Potenciadores de bradicinina;
- Entre outros.

Apesar da família *Viperidae* ter inúmeros componentes proteicos, cada espécie tem apenas um pequeno número de proteínas pertencentes às grandes famílias proteicas (Calvete, 2010). A maioria dos factores da coagulação e do sistema fibrinolítico são sintetizados e circulam no sangue sob a forma de zimogénio. Alguns factores exógenos agem de forma proteolítica, activando esses zimogénios (geralmente exibindo actividade pró-coagulante) ou agem promovendo a coagulação *per se* (Chudzinski-Tavassi *et al.*, 2014). Segundo Senise *et al.* (2015) os venenos, em particular, de serpentes do género *Bothrops* contêm várias toxinas que interferem na coagulação do sangue:

- Enzimas pró-coagulantes que activam directamente a protrombina ou o FX;

- Enzimas tipo trombina, ou seja, toxinas que clivam os fibrinopeptídeos do fibrinogénio, convertendo-o em fibrina;
- Enzimas fibrinogenolíticas que hidrolisam cadeias de fibrinogénio  $\alpha$  ou  $\beta$  mas não convertem fibrinogénio em fibrina;
- Activadores da proteína C;
- Proteínas similares a lectina tipo C que inibem as actividades biológicas da trombina ou dos factores IX / X.

As proteínas que estão presentes em grande quantidade nos venenos têm como função genérica a morte e a digestão das presas de forma inespecífica, enquanto outras de menor abundância podem ser mais maleáveis numa escala evolutiva. As mutações são a base para que a selecção natural opere e crie novas aptidões funcionais. Um subconjunto deste tipo de proteínas pode servir para ‘personalizar’ o veneno de um indivíduo de modo a especializar-se num tipo de presas em particular ou representar moléculas órfãs em evolução sob selecção neutra ‘em busca de uma função’. Assim, enquanto as abundantes proteínas constituintes dos venenos são os principais alvos para a imunoterapia, componentes minoritários podem ser como ‘canivetes suíços’ para o desenvolvimento biotecnológico (Calvete, 2009, 2010).

O genoma que determina um dado proteoma pode ser variável dependendo de vários factores endógenos e/ou exógenos. No caso das serpentes venenosas, a variação proteómica entre venenos tem sido ilustrada por diferentes perfis electroforéticos e distintas actividades farmacológicas. É um fenómeno omnipresente que é detectado em todos os níveis taxonómicos, desde espécies de diferentes regiões geográficas e habitats a espécies pertencentes à mesma ninhada. Além disso, a variação intra-específica ocorre devido à variação sazonal, dieta, idade e género. Estudos de serpentes em cativeiro indicaram que a variação intra-específica está sob o controlo genético, invés de induzida pelo ambiente, provavelmente devido à presença ou ausência de alelos que codificam proteínas específicas, por substituições de aminoácidos nas regiões que codificam proteínas maduras (Dias *et al.*, 2013). Dado a significância que as serpentes venenosas têm num determinado ecossistema como predadoras, é de esperar algum tipo de ajustes evolutivos entre predador e presa, levando talvez a uma ‘corrida de armas’. Os venenos, ainda que, determinados geneticamente, são, assim, sujeitos a forças selectivas que moldam a sua eficácia para determinada presa e para determinado nicho ecológico resultando num veneno mais específico (Calvete, 2013; Mackessy, 2009). Esta diversidade é considerada uma consequência da duplicação dos genes e uma acelerada evolução molecular para dotar o veneno com moléculas ligeiramente semelhantes mas estruturalmente diferentes ou até com novas moléculas com características

únicas (McCleary & Kini, 2013a) de forma a aumentar a diversidade molecular para lidar com potenciais presas (Dias *et al.*, 2013). Um exemplo desta rápida evolução é da *B. insularis* (serpente endêmica de uma ilha no estado de São Paulo) cujo perfil proteico é diferente das suas parentes que habitam o continente. Esta diferença está relacionada com a adaptação alimentar que passou de mamíferos para aves (Souza, Catharino, Ifa, Eberlin, & Hyslop, 2008). A complexidade proteômica da família *Viperidae* é contribuída por diversos mecanismos moleculares, incluindo o elevado grau de variação na sequência de aminoácidos em regiões não conservadas de algumas famílias de toxinas. Estas características resultam em proteínas com propriedades biofísicas e bioquímicas variáveis dentro da mesma família de toxinas, que muitas vezes mostram diferentes actividades biológicas (Paes Leme *et al.*, 2009).

## **Usos e aplicações**

---

Em conjunto com uma série de mitos, cultos e superstições, as serpentes e os seus venenos, à primeira vista, são vistos como ‘vilões’ pois são responsáveis por milhares de mortes em todo o mundo. Embora as mordeduras de serpentes sejam mortais, paradoxalmente, os seus venenos contêm componentes com potencial valor terapêutico (Calvete, 2010).

Os venenos representam um reservatório enorme e inexplorado essencialmente de componentes bioactivos (Calvete, 2009; Souza *et al.*, 2008), tendo sido o foco de muitas investigações nos últimos 70 anos, a maioria das quais, direccionada para a compreensão dos mecanismos bioquímicos e fisiológicos nos quais eles provocam os seus efeitos deletérios. Houve uma grande evolução no conhecimento adquirido em termos de como os venenos e as suas toxinas dão origem às síndromes associadas ao envenenamento e intoxicação (Fox & Serrano, 2007). A grande cornucópia farmacológica acumulada pela Natureza ao longo da evolução resultou em verdadeiras ‘bibliotecas’, com milhões de combinações moleculares úteis potencialmente activas e sintetizadas nos venenos (Calvete, 2009). No entanto, foi só na última década que surgiu um particular interesse na exploração da utilidade destas ‘bibliotecas’ naturais como medicamentos ou reagentes de diagnóstico (Fox & Serrano, 2007).

Para a indústria farmacêutica os venenos são considerados como ‘oceanos de oportunidades’ e a venómica como uma ciência de investigação (Calvete, 2009), estando, assim, a toxinologia no seu tempo áureo em termos de identificação e uso de toxinas (Fox & Serrano, 2007). Normalmente, os componentes dos venenos são bastante específicos para os seus substratos: as desintegrinas têm como alvo as plaquetas; as proteases hemorrágicas, as membranas basais; as fibrinogenases, o fibrinogénio; as toxinas pró-coagulantes e anticoagulantes, a cascata da



coagulação, como se pode ver na Figura 9. Uma vez purificados, caracterizados e clonados, podem ter potenciais aplicações como ferramentas para a investigação científica e desenvolvimento de novas classes de fármacos (Dias *et al.*, 2013; Hsu & Huang, 2010; Suntravat, Nuchprayoon, & Perez, 2010).

Há muito tempo que é sabido a capacidade de alguns venenos de serpentes induzir coagulação sanguínea, sendo este conhecimento posterior mesmo à hipótese da cascata da coagulação. Hoje em dia, é reconhecido que tais venenos interferem com muitos passos da cascata da coagulação, de fato, estiveram por trás da descoberta e compreensão desses mesmos passos (Tans & Rosing, 2001). Para quase todos os factores envolvidos na hemostase existe uma proteína no veneno de serpente que os pode mimetizar, activar, inibir ou degradar. Muitas destas proteínas não são afectadas por fármacos ou pelos mecanismos fisiológicos de regulação e, devido a estas características únicas, são aplicados como ferramentas moleculares para o diagnóstico de coagulopatias. Diferentes proteínas de origem ofídica são hoje em dia amplamente utilizadas nos laboratórios de hemostase, facilitando amplamente os ensaios de rotina e compreensão dos mecanismos biológicos básicos envolvidos nos processos de coagulação e fibrinólise. Algumas destas aplicações de rotina foram adoptadas como a opção *gold standart* em testes de diagnóstico (Braud *et al.*, 2000; Perchuc & Wilmer, 2010), por exemplo, para detectar *deficit* em factores de coagulação e monitorização de doentes submetidos a terapia anticoagulante (ver Anexo 4) (Chudzinski-Tavassi *et al.*, 2014). O facto de estas proteínas terem uma estrutura muito semelhante mas com actividades biológicas muito díspares, torna-as de grande interesse para estudos de estrutura/função (Braud *et al.*, 2000; J. Siigur *et al.*, 2005). Por outro lado, estas moléculas, por vezes, apresentam mais do que um centro activo e a investigação da interacção biológica de cada um deles é, também, de extrema importância (Moura-da-Silva & Baldo, 2012).

Análises proteómicas revelaram que as SVMPs representam uma grande e importante classe de proteínas no veneno das serpentes. Apesar dos seus efeitos negativos *in-vivo*, alguns membros desta classe, dado às suas estruturas primária e tridimensional muito semelhantes, podem ser úteis no tratamento de doenças que envolvam a alteração da coagulação (Markland & Swenson, 2013).

Moléculas pró-coagulantes de serpente, especialmente da família *Viperidae*, como iremos ver a seguir, têm sido utilizadas para desenvolver medicamentos tópicos pró-coagulantes em doentes com hemofilia ou outros problemas hemorrágicos com dificuldades em promover a hemostase (Suntravat *et al.*, 2010). Contudo, até à data, as aplicações mais importantes para as toxinas pró-coagulantes reservam-se à área de diagnóstico (ver Anexo 4) (Chudzinski-Tavassi *et al.*, 2014). Por outro lado o estudo de moléculas anticoagulantes desses venenos tem sido

usada para a descoberta de medicamentos para doentes que sofreram acidentes vascular cerebral ou doentes com distúrbios trombóticos (Suntravat *et al.*, 2010).

### **Exemplos específicos do uso de venenos ofídicos**

O primeiro impulso para o uso de venenos de serpente como medicamentos pró-coagulantes foi dado por Macfarlane e Barnett (1934) e Baker e Gibson (1936), que culminou, de forma bem-sucedida, na utilização local do veneno de *Daboia russelii* para o controle da hemorragia após pequenas cirurgias em pessoas saudáveis, assim como em hemofílicos, como por exemplo após uma cirurgia dentária. Isto deu origem ao mais tarde desenvolvido Stypven<sup>®</sup>, que agora é usado apenas como um reagente de diagnóstico para a activação do FX ou em alguns países como um hemostático local (Hutton & Warrell, 1993; Kornalík, 1985). Do veneno da mesma serpente, já mencionado, foi também purificado o RVV-X (S. Takeda *et al.*, 2007), podendo as suas utilizações ser consultadas no Anexo 4.

O primeiro fármaco com base em veneno de serpente foi o Captopril<sup>®</sup>, fundamentado na investigação associada à análise da estrutura/função de peptídeos biologicamente activos em venenos de serpentes da família *Viperidae*. Pertence à classe dos inibidores da enzima conversora da angiotensina e tendo salvado milhões de vidas com as suas propriedades anti-hipertensoras (Fox & Serrano, 2007; McCleary & Kini, 2013a).

Ancred e Batroxobina, comercialmente conhecidos como Viprinex<sup>®</sup> e Defibrase<sup>®</sup>, respectivamente, são indicadas como agentes desfibrinantes (Chudzinski-Tavassi *et al.*, 2014; Hutton & Warrell, 1993; Öhler *et al.*, 2010). Têm também sugerido bons resultados no tratamento de nefropatia trombótica, lupus eritematoso sistémico e em trombocitopenia induzida por heparina (Hutton & Warrell, 1993).

Botropase<sup>®</sup> é um bom exemplo das possíveis aplicações terapêuticas de um activador de FX, sendo uma molécula derivada da batroxobina com propriedades hemocoagulantes utilizada para estancar um processo hemorrágico inespecífico. Regra geral a injeção de botropase<sup>®</sup> é bem tolerada sem evidência de episódios tromboembólicos ou outros efeitos adversos graves (Shenoy, Ramesh, Chowta, Adhikari, & Rathnakar, 2014).

Como é possível verificar muitas são as possibilidades do uso de toxinas de origem ofídica e podemos estar apenas na ‘ponta do iceberg’. Investigações em curso levam ao isolamento e caracterização de novos componentes de veneno de serpente, que são instrumentos potenciais para futuras aplicações no campo da hemostase, em diagnóstico, bem como em abordagens terapêuticas (Perchuc & Wilmer, 2010). Pode-se ter como exemplo um SVMP em fase III dos ensaios clínicos para o tratamento da doença arterial obstrutiva periférica e acidente vascular

cerebral. Os membros desta ampla e importante classe de proteases pode, no futuro, encontrar outras aplicações no qual pode beneficiar a saúde humana (Markland & Swenson, 2013).

## **Técnicas laboratoriais usadas no estudo dos venenos**

---

O estudo e caracterização de venenos, seja qual for a sua origem, envolvem sempre várias etapas, nomeadamente de colheita, processamento, purificação, análise biológica e bioquímica, identificação. Para concluir com sucesso cada etapa são utilizadas diversas técnicas laboratoriais, em simultâneo ou em sequência, sendo abordadas sumariamente neste ponto, apenas as que foram usadas neste estudo.

### **1. Técnicas de purificação**

#### **1.1. Cromatografia**

A cromatografia é uma técnica laboratorial desenvolvida para separar substâncias contidas numa mistura, neste caso a separação da proteína de interesse do veneno bruto (VB). Esta técnica funciona pela interacção da fase móvel (veneno) com a fase estacionária (coluna de cromatografia) levando a uma separação. Esta irá depender do tipo de interacção da fase móvel com a fase estacionária (por tamanho, carga, hidrofobicidade ou reconhecimento biológico).

##### **1.1.1. Cromatografia de troca iónica**

Esta técnica cromatográfica separa moléculas com base na sua carga eléctrica líquida. Cada proteína tem a sua própria carga e a sua relação com o pH do meio é única para uma determinada proteína. Assim ocorrem interacções, de forma controlada e reversíveis, entre a fase móvel e a fase estacionária de carga oposta de modo a favorecer a ligação ou eluição de moléculas específicas e conseguir uma separação. Sendo as proteínas moléculas anfotéricas, a carga destas depende do pH. Assim a um pH equivalente ao seu ponto isoeléctrico (PI) não possui carga eléctrica líquida, adquire carga neutra e não interage com a fase estacionária. No entanto, a um pH acima do seu PI, uma proteína ligar-se-á a materiais de carga positiva, pelo contrário, a um pH abaixo do seu PI, ligar-se-á a materiais de carga negativa.

O pH e a força iónica do tampão de equilíbrio são seleccionados para assegurar que, quando a amostra é carregada na coluna, as proteínas com carga de interesse se ligam e que tudo o resto seja eluído. Após toda a amostra ser carregada na coluna e não houver mais moléculas a serem eluídas as condições são alteradas a fim de eluir as proteínas ligadas. Na maioria das vezes, as proteínas são eluídas por aumento da força iónica do tampão (aumentando a concentração de sal) ou, ocasionalmente, por alteração do pH. O aumento da força iónica vai promover uma competição com as moléculas ligadas à coluna, sendo que as de carga mais

fracas serão as primeiras a saírem, promovendo uma separação à medida que é aumentada a força iónica. Quanto maior for a carga líquida da proteína, maior será a força iónica necessária para a sua eluição.

### **1.1.2. Cromatografia de filtração em gel**

Esta técnica cromatográfica tem por base a separação de moléculas de acordo com sua massa molecular. Pode ser uma separação mais ou menos refinada, com separação de moléculas com diversos tamanhos moleculares ou uma separação apenas em moléculas de alto e baixo peso molecular, respectivamente. A separação ocorre pela passagem das moléculas por uma matriz porosa, assim moléculas maiores vão eluir mais rapidamente, enquanto que as mais pequenas serão atrasadas pela maior área de superfície que têm de percorrer devido à porosidade da matriz.

### **1.1.3. Cromatografia de fase reversa**

A cromatografia de fase reversa é realizada num equipamento de sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e ocorre por ligação de uma molécula da fase móvel aquosa (polar) ao n-alquilo de um hidrocarboneto imobilizado ou a um ligando aromático (não polar) através de interações hidrofóbicas, favorecendo a entropia.

A distribuição de moléculas entre as duas fases depende da sua hidrofobicidade, das propriedades de ligação da fase estacionária e da composição da fase móvel. Inicialmente, as condições experimentais são desenhadas para favorecer a adsorção das moléculas a partir da fase móvel para a fase estacionária. Subsequentemente, a composição da fase móvel é modificada para favorecer a dessorção da fase estacionária de volta para a fase móvel. As moléculas adsorvem fortemente à superfície de uma matriz de fase reversa sob condições aquosas, contudo a dessorção ocorre numa janela muito estreita de concentração de solventes orgânicos, quanto mais polar for a molécula, maior a velocidade da sua dessorção.

Em resumo, as separações numa cromatografia de fase reversa dependem da reversível adsorção/dessorção das moléculas com vários graus de hidrofobicidade para uma fase estacionária hidrofóbica.

## 2. Técnicas de caracterização

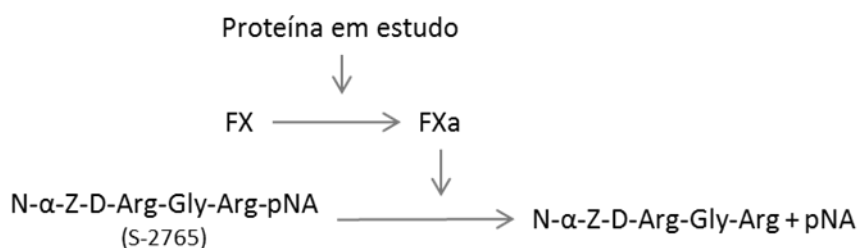
### 2.1. Estudo em substratos cromogénicos

#### 2.1.1. Activação

Este procedimento baseia-se no uso de substratos cromogénicos para analisar a actividade proteolítica das proteínas em estudo<sup>18</sup>.

- S-2765 (Chromogenix<sup>®</sup>) – É um substrato cromogénico específico para o FXa. A sua fórmula, *N-α-Benzoyloxycarbonyl-D-arginyl-L-Glycyl-L-Arginine-p-nitroaniline dihydrochloride* (N-α-Z-D-Arg-Gly-Arg-pNA), contém um cromóforo que, quando clivado, forma uma solução corada (Figura 11). Este método permite medir a diferença de absorvância entre o cromóforo e a solução original. A taxa de cromóforo libertado aumenta a absorvância a 405 nm, sendo proporcional à actividade enzimática.

Figura 11 - Esquema representativo do ensaio de activação de FX.



- S-2238 (Chromogenix<sup>®</sup>) – É um substrato cromogénico específico para a trombina. A sua fórmula, *D-Phenylalanyl-L-Pipecolyl-p-nitroaniline dihydrochloride* (H-D-Phe-Pip-Arg-pNA), tem também um cromóforo que, quando clivado, forma uma solução corada, sendo o princípio do ensaio igual ao S-2765 (Chromogenix<sup>®</sup>).

#### 2.1.2. Inibição

Os estudos de inibição seguem o mesmo princípio dos ensaios de activação com a diferença que as amostras são previamente incubadas com inibidores selectivos para diferentes classes de proteases. Assim é possível aferir a classe ao qual a proteína em estudo pertence dependendo do inibidor que provocar a inibição da sua actividade.

Inibidores usados:

- EDTA inibe a actividade proteolítica das metaloproteases por quelação do  $\text{Ca}^{2+}$  essencial à reacção e/ou por remoção dos iões metálicos das metaloproteases alterando a sua conformação, deixando as SVMP sensíveis a este composto.

<sup>18</sup> Será apenas explicado o modo de funcionamento dos substratos usados neste trabalho.

- PMSF<sup>19</sup> (Fluoreto de Fenilmetilsulfonil) é um inibidor de serina endopeptidases por se ligar irreversivelmente ao sítio activo da proteína, deixando esta sem capacidade de se ligar ao seu substrato.
- E-64<sup>20</sup> é um potente inibidor altamente selectivo de Cisteína-proteases, que se liga de forma irreversível ao grupo tiol das proteases.

## 2.2. Análise da massa molecular

A massa molecular pode ser calculada por observação de uma electroforese quando se compara a banda a um marcador de massa molecular padrão. Contudo existem outros métodos de aferir a massa molecular com maior precisão, como a ionização e dessorção a laser assistida por matriz (MALDI)<sup>21</sup>.

MALDI-TOF<sup>22</sup> é uma técnica em espectrometria de massa que permite a análise de biomoléculas de uma forma suave, sem que estas se fragmentem quando ionizadas. A base desta técnica prende-se com o recurso de uma matriz, esta vai cristalizar juntamente com a amostra. Quando esta mistura é incidida por um feixe de raio ultravioleta sob vácuo há uma ablação e dessorção da amostra onde é ionizada na fase gasosa, ganhando ou perdendo prótons. As moléculas ionizadas são assim aceleradas e divididas consoante a sua massa molecular, sendo possível assim por esta técnica ter conhecimento preciso de uma molécula. Esta técnica é também bastante útil pois é possível obter resultado com baixos volumes e concentrações de amostra de até 1/2 µL.

## 2.3. Estudo do ponto de clivagem

O ponto de clivagem é o ponto no qual a enzima vai clivar a proteína na sua cadeia polipeptídica. Neste estudo foi determinada com vista a perceber a activação do FX feita pela proteína em estudo. A partir da sequência de aminoácidos do FX, foi inserida a massa exacta dos fragmentos encontrados experimentalmente, e assim, visto quais os fragmentos de FX existiam. Por comparação destes fragmentos com a sequência do FX é possível saber onde o FX foi clivado.

## 3. Técnicas de identificação

### 3.1. Sequenciação parcial por espectrometria de massa (EM)

A espectrometria de massa é uma técnica analítica que permite a identificação da composição química de um determinado composto isolado, ou de diferentes misturas complexas, através

<sup>19</sup> PMSF do inglês *phenylmethanesulfonyl fluoride*.

<sup>20</sup> Também conhecido como (1S,2S)-2-(((S)-1-((4-Guanidinobutyl)amino)-4-methyl-1-oxopentan-2-yl)carbamoyl)cyclopropanecarboxylic acid segundo a IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry* (União Internacional de Química Pura e Aplicada)).

<sup>21</sup> MALDI do inglês *Matrix-assisted Laser Desorption Ionization*.

<sup>22</sup> TOF do inglês *Time of Flight* (tempo de voo)

da determinação das suas massas moleculares na forma ionizada, de forma rápida e com baixas concentrações de material. Além de fragmentar o peptídeo proveniente de uma digestão triptica da proteína, dando informações da sequência de aminoácidos.

### **3.2. Sequenciação de aminoácidos pela técnica de degradação de *Edman***

Esta técnica de sequenciação proteica baseia-se na determinação da ordem dos aminoácidos na cadeia peptídica pela reacção do aminoácido N-terminal de uma proteína pura (para esta técnica é necessário assegurar a pureza da solução) com fenil-isotiocianato (PITC). A proteína modificada é submetida a hidrólise ácida libertando o aminoácido N-terminal modificado, sendo este posteriormente identificado por cromatografia. Segue-se um novo ciclo de reacção com o próximo aminoácido na proteína, que se tornou o novo N-terminal. O número de ciclos é programado consoante a quantidade de aminoácidos desejada, mas está limitada pela concentração proteica.

O Método de degradação de *Edman* compreende ciclos de reacção com três etapas cada:

- Reacção da proteína com PITC, que se acopla ao grupo amina  $\text{NH}_2$ -livre do 1º aminoácido;
- Hidrólise ácida da proteína conjugada com PITC liberta feniltiohidantoína (PTH) do 1º aminoácido e o restante da proteína, tornando o 2º aminoácido o novo resíduo N-terminal;
- Segue-se a análise cromatográfica do PTH-aminoácido e um novo ciclo de reacção com o novo N-terminal da proteína. Este processo repete-se tantas vezes quantas necessárias e programadas, dependendo da concentração de material disponível e do ensaio propriamente dito.

## **4. Técnicas gerais**

### **4.1. Dosagem proteica**

#### **4.1.1. Quantificação por ensaio do ácido bicinconínico<sup>23</sup>**

A quantificação proteica por BCA é um método colorimétrico de alta precisão que nos dá a concentração total de proteínas presentes numa amostra utilizando-se uma curva-padrão, com diluições de albumina bovina, para a realização dos cálculos de concentração. Este método, proposto por P. K. Smith *et al.* (1985), baseia-se na reacção do cobre com as proteínas produzindo  $\text{Cu}^+$ . Este último forma um complexo com o BCA formando uma coloração roxa,

---

<sup>23</sup> Também conhecido como BCA assay do inglês *bicinchoninic acid assay*

tanto mais forte quanto a concentração de proteína, que absorve fortemente na região de A 560 nm.

#### **4.1.2. Quantificação for espectrofotometria**

A quantificação proteica por espectrofotometria parte do princípio da absorvância das proteínas ser a A 280 nm. Assim, quanto maior a absorvância nesse comprimento de onda maior irá ser a concentração proteica. O uso de equipamentos como o espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific®), permite de forma eficaz determinar a concentração proteica com volumes de apenas 0,5 – 1 µL.

#### **4.2. Análise electroforética por SDS-PAGE<sup>24</sup>**

A electroforese é uma técnica de separação de moléculas de acordo com a sua massa molecular. Esta técnica tem por base a migração de partículas num gel durante a aplicação de uma tenção eléctrica. Num SDS-PAGE as proteínas vão ligar-se ao SDS conferindo-lhes carga negativa, permitindo assim que migrem para o polo positivo. A separação propriamente dita deve-se à poliacrilamida que forma uma ‘peneira’ fazendo com que moléculas de maior massa molecular demorem mais a percorrer o gel que as de baixa massa molecular. Como resultado, a amostra é fraccionada numa série de bandas de proteínas arranjadas de acordo com a sua massa molecular.

---

<sup>24</sup> *SDS-PAGE* - Electroforese em Gel de Poliacrilamida com Dodecil sulfato de sódio do inglês (*Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*).



## **Capítulo III - Isolamento e caracterização biológica e bioquímica de um activador do factor X da coagulação presente no veneno da serpente *Bothrops Erythromelas***

### **1. Objectivos**

---

O veneno da serpente *B. erythromelas*, a exemplo de outros venenos ofídicos, é composto por diversas substâncias, entre as quais um activador de FX, o que era do conhecimento do laboratório de Bioquímica e Biofísica do Instituto Butantan. No entanto, este activador de FX nunca foi caracterizado.

Dada a importância deste tipo de moléculas, bem como das possíveis aplicações, a sua caracterização reveste-se de grande relevância, sendo o primeiro passo para uma eventual utilização.

Com o objectivo geral de caracterizar o activador do FX do veneno da *B. erythromelas* foi delineado um protocolo cujos objectivos específicos eram:

- Colheita do veneno;
- Purificação da proteína responsável por esta actividade (activação do FX);
- Caracterização biológica e bioquímica;
- Sequenciação e identificação proteica;

### **2. Material e Métodos**

---

#### **2.1. Colheita e processamento de Veneno Bruto**

O veneno de *B. erythromelas* foi cedido pelo laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan (São Paulo, Brasil). Este foi obtido a partir de extracções manuais de um *pool* de serpentes de ambos os sexos, utilizando dióxido de carbono como anestésico. Após extracção do veneno para uma placa de *Petri* por compressão da glândula de veneno foi recolhido com uma micropipeta. Seguidamente foi submetido a centrifugação a 15294.24 g, sob refrigeração a 4 °C na centrífuga 5810R (Eppendorf®), para remoção dos detritos celulares. Posteriormente o sobrenadante foi liofilizado e conservado a -20 °C. Do veneno liofilizado foi pesado 4,7 mg de veneno numa balança de precisão GR-200 (AND®) e ressuspendido em 1 mL de solução salina (NaCl (Synth®) 0,9%). Esta solução foi submetida a doseamento proteico com duas diluições 1:5 e 1:10 em solução salina e em duplicado, segundo a técnica de BCA usando uma equação da recta, obtida através do padrão, segundo o ponto 2.5.1.1 do Material e Métodos. Sempre que necessário era ressuspenso mais veneno em solução salina.

## **2.2. Purificação da proteína activadora de FX**

### **2.2.1. Cromatografia de filtração em gel**

#### **Cromatografia de filtração em gel TSKgel G2000SW (Tosoh BioScience®)**

A técnica foi realizada com a coluna TSKgel G2000SW (Tosoh BioScience®), equilibrada em acetato de amónio (USB™) 100 mM pH 7,3. O processo foi conduzido no sistema ÄKTA Purifier 100 (GE Healthcare®), com recurso a um *loop* de 200 µL, seguindo as instruções do fabricante. O procedimento foi controlado pelo *software* Unicorn versão 5.0, (GE Healthcare® - código 18-1023-85). O modo de colheita foi feito a cada 1 mL com um colector automático (GE Healthcare®) acoplado ao sistema, em sala climatizada a 24 °C. A coluna foi equilibrada com acetato de amónio (USB™) 100 mM pH 7,3 (tampão de equilíbrio), com 5 VC. Foi injectado 200 µL de veneno bruto (equivalente a 820 µg) e a eluição isocrática a um fluxo de 0,5 mL/min. O cromatograma foi monitorizado de acordo com as seguintes absorvâncias: A 280 nm (traço azul), A 254 nm (traço cor-de-rosa) e A 214 nm (traço a vermelho).

As fracções colectadas foram submetidas a liofilização e posteriormente ressuspensas em solução salina para posteriores ensaios.

#### **2.2.1.1. Alterações ao método**

Colheita manual de acordo com a absorvância a 280 nm e com fluxo de 0,6 mL/min. Diminuição do volume morto do equipamento (substituição da célula de *backpressure* por um T e redução do volume interno das conexões).

### **2.2.2. Cromatografia de fase reversa**

#### **Cromatografia de fase reversa C4 (apHera™ - Sigma-Aldrich®)**

Neste processo cromatográfico foi usada a coluna HPLC C4 25 cm x 4,6 mm (apHera™ - Sigma-Aldrich®), equilibrada numa solução de água e ácido acético 0,1%, acoplada ao equipamento HPLC LC-10A (Shimadzu Corporation®). A montagem, empacotamento e eficiência foram avaliados de acordo com o manual do fabricante. A coluna foi equilibrada com 5 VC de uma solução de água e ácido acético (Synth®) 0,1%. A amostra previamente liofilizada e ressuspensa em 5 µL de água mais ácido acético (Synth®) a 0,1% sendo injectado na coluna. Após injeção, a eluição foi realizada através de gradiente linear de solução A (água e ácido acético (Synth®) 0,1%) e solução B (90% acetonitrilo (ACN) (Sigma-Aldrich®), 0,1% ácido acético (Synth®) e água mQ) num fluxo de 1 mL/min. A colheita foi feita de modo manual dos picos a A 280 nm.

## 2.3. Caracterização biológica e bioquímica

### 2.3.1. Estudo de activação em substratos cromogénicos

#### 2.3.1.1. Activação do FX

Foram realizados vários estudos de activação do FX, tanto para o VB como para as fracções provenientes das cromatografias, sendo o protocolo aplicado sempre o mesmo.

Durante os diferentes procedimentos foram usadas diferentes concentrações de amostra, sendo o volume aplicado igualmente variável.

O procedimento foi realizado numa placa de 96 poços, cujo protocolo foi o seguinte:

X<sup>25</sup> µL de Veneno + Y<sup>26</sup> µL de tampão (Tris-HCl (*Sigma-Aldrich*®) 25 mM, NaCl (*Synth*®) 200 mM, ClCa<sup>2+</sup> 10 mM) pH 8,3 + 3 µL FX (*Calbiochem*®) 0,54 µM (concentração final de 0,0081 µM), posteriormente era adicionado 5 µL do substrato cromogénico S- 2765 (*Chromogenix*®) 8mM para uma concentração final de 0,2 mM, num volume final de 200 µL. A actividade residual do FXa foi avaliada através da hidrólise do substrato S-2765 (*Chromogenix*®), e a consequente libertação da p-nitroanilina (cromóforo), avaliada em A 405 nm registradas a cada 30 segundos, durante 20 a 30 minutos (dependendo do ensaio) a 37 °C no espectrofotómetro SpectraMax M Series (*Molecular Devices*®).

Os controlos foram efectuados nas mesmas condições dos ensaios, tendo sido usado para controlo positivo o FXa bovino (*Chromogenix*®) (concentração final de 0,055 µM) + S-2765 (*Chromogenix*®) + tampão. Para controlos negativos da reacção foram usados 1) FX (*Calbiochem*®) + S-2765 (*Chromogenix*®) + tampão; 2) Veneno + S-2765 (*Chromogenix*®) + tampão; 3) S-2765 (*Chromogenix*®) + tampão.

Todos os ensaios foram efectuados em duplicado<sup>27</sup>.

#### 2.3.1.2. Activação da Protrombina

Foram realizados vários estudos de activação da protrombina tanto para o VB como para as fracções provenientes das cromatografias, sendo o protocolo aplicado sempre o mesmo.

Durante os diferentes procedimentos foram usadas diferentes concentrações de amostra, sendo o volume aplicado igualmente variável.

O procedimento foi realizado numa placa de 96 poços, cujo protocolo foi o seguinte:

X<sup>28</sup> µL de Veneno + Y<sup>29</sup> µL de tampão (Tris-HCl (*Sigma-Aldrich*®) 50 mM, NaCl (*Synth*®) 100 mM,) pH 8,3 + 4,4 µL protrombina (*Calbiochem*®) 40 mM (concentração final de 1,8

---

<sup>25</sup> O volume de veneno era variável consoante a concentração, a disponibilidade da amostra ou os resultados pretendidos.

<sup>26</sup> O volume de tampão estava dependente do volume do volume de veneno necessário para o ensaio e era complementar para perfazer os 200µL.

<sup>27</sup> Quando a quantidade de amostra disponível o permitia.

<sup>28</sup> O volume de veneno era variável consoante a concentração, a disponibilidade da amostra ou os resultados pretendidos.

mM), posteriormente era adicionado 4  $\mu$ L do substrato cromogénico S- 2238 (Chromogenix<sup>®</sup>) 10mM para uma concentração final de 0,2 mM, num volume final de 200  $\mu$ L. A actividade residual da trombina foi avaliada através da hidrólise do substrato S-2238, e a consequente libertação da p-nitroanilina (cromóforo), avaliada em A 405 nm registradas a cada 30 segundos, durante 20 a 30 minutos (dependendo do ensaio) a 37 °C no espectrofotómetro SpectraMax M Series (Molecular Devices<sup>®</sup>).

Os controlos foram efectuados nas mesmas condições dos ensaios, tendo sido usado para controlo positivo trombina (Calbiochem<sup>®</sup>) (concentração final de 2  $\mu$ M) + S-2238 (Chromogenix<sup>®</sup>) + tampão. Para controlos negativos da reacção foram usados 1) protrombina (Calbiochem<sup>®</sup>) + S-2238 (Chromogenix<sup>®</sup>) + tampão; 2) Veneno + S-2238 (Chromogenix<sup>®</sup>) + tampão; 3) S-2238 (Chromogenix<sup>®</sup>) + tampão.

Todos os ensaios foram efectuados em duplicado<sup>30</sup>.

### **2.3.2. Estudos de inibição**

#### **2.3.2.1. Com recurso a compostos inibidores**

Nestes ensaios foi usado primeiramente VB e depois as fracções provenientes das cromatografias.

Assim foram usados os seguintes inibidores (concentrações finais):

- EDTA (Dinâmica<sup>®</sup>) - 5 mM ou 20 mM.
- PMSF (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>) - 5mM.
- E-64 (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>) – 2 mM.

Durante os diferentes procedimentos foram usadas diferentes concentrações de amostra, sendo o volume aplicado igualmente variável.

O procedimento foi realizado numa placa de 96 poços, cujo protocolo foi o seguinte:

Incubar X<sup>31</sup>  $\mu$ L de Veneno + Y<sup>32</sup>  $\mu$ L de tampão (Tris-HCl (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>) 25 mM, NaCl (Synth<sup>®</sup>) 200 mM, ClCa<sup>2+</sup> 10 mM) pH 8,3 + Z  $\mu$ L Inibidor<sup>33</sup> (quando presente) a 37 °C por 20 minutos.

Posteriormente adicionar 3  $\mu$ L FX (Calbiochem<sup>®</sup>) 0,54  $\mu$ M (concentração final de 0,0081  $\mu$ M) + 5  $\mu$ L do substrato cromogénico S- 2765 (Chromogenix<sup>®</sup>) 8 mM para uma concentração final de 0,2mM, num volume final de 200  $\mu$ L. A actividade residual do FXa foi

---

<sup>29</sup> O volume de tampão estava dependente do volume do volume de veneno necessário para o ensaio e era complementar para perfazer os 200 $\mu$ L.

<sup>30</sup> Quando a quantidade de amostra disponível o permitia.

<sup>31</sup> O volume de veneno era variável consoante a concentração, a disponibilidade da amostra ou os resultados pretendidos.

<sup>32</sup> O volume de tampão estava dependente do volume do volume de veneno necessário para o ensaio e era complementar para perfazer os 200 $\mu$ L.

<sup>33</sup> O volume e o tipo de inibidor depende do ensaio em questão.

avaliada através da hidrólise do substrato S-2765 (Chromogenix<sup>®</sup>), e a consequente libertação da p-nitroanilina (cromóforo), avaliada em A 405 nm registradas a cada 30 segundos, durante 30 minutos a 37°C no espectrofotómetro SpectraMax M Series (Molecular Devices<sup>®</sup>).

Os controlos foram efectuados nas mesmas condições dos ensaios, tendo sido usado para controlo positivo 1) FXa bovino (Chromogenix<sup>®</sup>) (concentração final de 0,055 µM) + S-2765 (Chromogenix<sup>®</sup>) + tampão; 2) FXa bovino (Chromogenix<sup>®</sup>) (concentração final de 0,055 µM) + S-2765 (Chromogenix<sup>®</sup>) + tampão + inibidor. Para controlos negativos da reacção foram usados 1) FX (Calbiochem<sup>®</sup>) + S-2765 (Chromogenix<sup>®</sup>) + tampão; 2) FX (Calbiochem<sup>®</sup>) + S-2765 (Chromogenix<sup>®</sup>) + tampão + inibidor; 3) Veneno + S- 2765 (Chromogenix<sup>®</sup>) + tampão; 4) S-2765 (Chromogenix<sup>®</sup>) + tampão + inibidor.

Todos os ensaios foram efectuados em duplicado<sup>34</sup>.

#### **2.3.2.2. Sem adição de cálcio à reacção**

O procedimento foi efectuado com 1,37 µg de VB igual ao descrito no ponto 2.3.1.1 cuja alteração ao método se encontra no tampão. O tampão usado no processo foi Tris-HCl (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>) 25mM, NaCl (Synth<sup>®</sup>) 200 mM, pH 8,3.

#### **2.3.3. Análise da massa molecular com recurso a Ionização e dessorção a laser assistida por matriz (MALDI)<sup>35</sup>**

Para este procedimento as amostras foram cristalizadas na placa metálica do equipamento juntamente com a matriz, uma solução saturada de ácido sinapínico. Posteriormente a placa foi introduzida no espectrómetro de massa MALDI-TOF Axima Performance (Shimadzu Corporation<sup>®</sup>). As amostras foram incididas, de forma manual, por pulsos de laser para a ionização, em modo positivo, numa faixa de massas de 1.000 a 90.000 Da. Foram acumulados até mil espectros que foram posteriormente processados para identificação da proteína por meio da análise da massa molecular.

#### **2.3.4. Determinação do ponto de clivagem por espectrometria de massa**

Para determinação do ponto de clivagem foi incubado 5µg da fracção purificada com 5 µL de FX (Calbiochem<sup>®</sup>) a 0,54 µM e 100 µL de tampão (Tris-HCl (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>) 25 mM, NaCl (Synth<sup>®</sup>) 200mM, ClCa<sup>2+</sup> 10 mM) pH 8,3 por duas horas a 37 °C, tendo a reacção sido parada com a adição de 10 µL de Ácido trifluoroacético (TFA)<sup>36</sup> 0,1% findas as duas horas. Posteriormente foi realizada uma cromatografia de fase reversa, em coluna C4 2,1x50 mm (Phenomenex<sup>®</sup>), acoplada a espectrometria de massa do tipo *electrospray* LCMS-IT-TOF<sup>™</sup>

<sup>34</sup> Quando a quantidade de amostra disponível o permitia.

<sup>35</sup> MALDI do inglês *Matrix-assisted Laser Desorption Ionization*.

<sup>36</sup> TFA do inglês *Trifluoroacetic acid* (Ácido Trifluoroacético).

(Shimadzu Corporation®). A corrida decorreu de 5% de TFA (0,1%) a 55% de TFA (0,09%) mais acetonitrilo (Sigma-Aldrich®). As massas moleculares das moléculas, representada por meio de picos detectados na corrida, foram analisadas e introduzidas no *software* de espectrometria de massa (MassLynx™).

## **2.4. Sequenciação e identificação proteica**

### **2.4.1. Sequenciação parcial por espectrometria de massa (EM)**

As amostras para análise foram provenientes de bandas proteicas reveladas no gel SDS-PAGE. As bandas de interesse foram recortadas do gel, digeridas (método descrito no ponto 2.4.1.1 do Material e Métodos) e submetidas a análise no espectrómetro de massa do tipo *electrospray* LCMS-IT-TOF™ (Shimadzu Corporation®) e analisadas com o *software* de espectrometria de massa LC Solutions.

As amostras foram submetidas a uma cromatografia em coluna Supelco® C18 2,1 x 50 mm (Sigma-Aldrich®) em gradiente de 5 a 40% de solvente B por 20 minutos, em fluxo constante de 0,2 mL/min, sendo os solventes A = ácido acético (Synth®) em água mQ (1:1000) e B = ácido acético (Synth®) + ACN (Sigma-Aldrich®) + água (1:900:100). O conteúdo eluído foi automaticamente inserido no espectrómetro de massa em modo positivo. Análises em modo MS foram feitas com a aquisição de dados na faixa de 50 a 2000 m/z. Os iões de interesse foram fragmentados por gás argónio (50% de energia), numa faixa de massa de 100 a 1500 m/z.

Os resultados das sequências parciais são posteriormente comparados com outras sequências proteicas do bando de dados do nrNCBI<sup>37</sup> e sequenciação de novo pelo *PEAKS software*® (Bioinformatics Solutions Inc.) usando ferramentas de bioinformática (ver ponto 2.4.3 do Material e Métodos).

#### **2.4.1.1. Por extracção de bandas do gel de poliacrilamida**

As bandas contêm na sua malha de acrilamida as proteínas de interesse. Para a sua remoção para posterior análise é necessário promover a descoloração, redução, alquilação, tripsinização e posterior extracção.

As bandas recortadas do gel SDS-PAGE, quando coradas por Coomassie Brilliant Blue® R-250 (Sigma-Aldrich®), são descoradas com metanol (Synth®) 50% e ácido acético (Synth®) 5%, em água mQ e mantidas por 2 horas à temperatura ambiente. Quando coradas por nitrato de prata (Plat-Lab®) o procedimento de descoloração passa pela lavagem do gel com uma solução de tiosulfato de sódio (Emsure®) 100 mM e ferrocianeto de potássio (Emsure®) 30

---

<sup>37</sup> nrNCBI do inglês *National Center for Biotechnology Information* (Centro nacional para a informação biotecnológica), “nr” significa *non redundant* (não redundante).

mM, na proporção de 1:1, até a completa remoção do nitrato de prata, posteriormente o gel é lavado com água mQ.

Após a etapa de descoloração o gel é desidratado com 200 µL de ACN (Sigma-Aldrich®) 100% por 5 minutos. Para a redução, adiciona-se 30 µL de ditioneitol (DTT) (Sigma-Aldrich®) (10 mM), seguido de incubação por 30 minutos. O DTT é removido e adicionado 30 µL da solução de iodoacetamida (Sigma-Aldrich®) (50 mM) para alquilação, por 30 minutos a temperatura ambiente. A solução de iodoacetamida é retirada e o gel é lavado com bicarbonato de amónio (Emsure®) (100 mM) por 10 minutos. Em seguida, o gel é desidratado com 200 µL de ACN (100%) e submetido a incubação por 5 minutos e reidratado com 200 µL de bicarbonato de amónio (100 mM) por 10 minutos. O gel é desidratado novamente da mesma forma, e a tripsinização é realizada adicionando-se 16 µL da solução de tripsina (Sigma-Aldrich®) (50 µg/mL) em bicarbonato de amónio (50 mM), permanecendo por 30 minutos em gelo. Após este período, adiciona-se 20 µL de bicarbonato de amónio (50 mM) e a amostra é mantida em banho seco a 37 °C por 16 a 18 horas. Os peptídeos obtidos após a tripsinização são extraídos por lavagens com 10 µL de uma solução de água mQ e ácido fórmico (Emsure®) (5%), e incubados por 10 minutos a temperatura ambiente. Adiciona-se em seguida, 12 µL de ácido fórmico (Emsure®) (5%) em ACN (Sigma-Aldrich®) (50%) e incuba-se por 10 minutos a temperatura ambiente. Os peptídeos obtidos são secos na centrífuga de vácuo Speedvac RVC-2-18 CDPlus (Christ®) por aproximadamente 40 minutos, onde são posteriormente reconstituídos em água contendo ácido acético (Synth®) 0,1% e injectados na coluna C18 para sequenciação, como referido acima.

#### **2.4.2. Sequenciação de aminoácidos pela técnica de degradação de *Edman***

Foram colocados 15 µL de amostra numa membrana de PVDF<sup>38</sup>, esta teve de ser submetida a secagem no próprio equipamento PPSQ-21A (Shimadzu Corporation®), posteriormente é inserida onde ocorrem todas as reacções. Os aminoácidos liberados durante o processo foram analisados numa coluna C18 (4,6 x 200 mm) (Kromasil®), e o tempo de retenção foi comparado a um padrão de aminoácidos. Neste ensaio foram programados 10 ciclos.

---

<sup>38</sup> PVDF do inglês *polyvinylidene difluoride* (fluoreto de polivinilideno).

### **2.4.3. Ferramentas de Bioinformática para avaliação dos resultados do espectrómetro de massa com recurso a MASCOT (*Matrix Science*) e PEAKS software® (*Bioinformatics Solutions Inc.*)**

Os dados do EM foram introduzidos *on-line* usando estes *softwares* com as seguintes definições de busca. Tolerância de 0,5 Da para péptidos e 0,5 Da para fragmentos MS/MS. A enzima usada foi tripsina com o máximo de uma clivagem em falta, foi permitido como modificações fixas a Carbamidometilação de cisteína e como modificações variáveis a oxidação de metionina. A carga dos péptidos seleccionada foi de +1, +2 e +3. Os péptidos foram considerados identificados pelo *software* quando alcançada probabilidade inferior a 0,05 (probabilidade baseada na pontuação iónica com limiar superior a 40). Proteínas eram consideradas identificadas quando identificado pelo menos dois péptidos. Para comparação de espectros de massa, foi utilizado o banco de dados nrNCBI e um banco próprio para toxinas de serpentes, construído pelo laboratório, com base em transcriptomas de glândulas de várias espécies. O *PEAKS software*® (*Bioinformatics Solutions Inc.*) permitiu ainda efectuar sequenciação de novo.

## **2.5. Técnicas gerais**

### **2.5.1. Dosagem proteica**

#### **2.5.1.1. Quantificação pela técnica do ácido bicinconínico<sup>39</sup>**

O procedimento foi realizado numa placa de 96 poços, onde as amostras foram incubadas a 37 °C por 30 minutos. A absorvância foi lida em A 562 nm no espectrofotómetro SpectraMax M Series (Molecular Devices®). Como controle negativo utilizou-se solução salina e como controlo positivo albumina bovina<sup>40</sup> (Sigma-Aldrich®).

Todas as quantificações feitas por este método foram realizadas com o *kit Pierce BCA “protein assay”* (Pierce - Thermo Scientific®) segundo as instruções do fabricante.

#### **2.5.1.2. Quantificação por espectrofotometria**

Neste procedimento foi usado o espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific®), pelo facto de ser um equipamento altamente sensível, preciso e capaz de dar uma determinação da concentração proteica com volumes de apenas 0,5 – 1 µL. O método passa por colocar apenas uma gota, com os volumes previamente indicados, para ser feita a leitura.

---

<sup>39</sup> Também conhecido como *BCA assay* do inglês *bicinchoninic acid assay*

<sup>40</sup> Curva de diluição preparada de 2.000 µg/mL a 25 µg/mL, o qual serve para fazer a curva-padrão para posteriormente calcular as concentrações proteicas.



### 2.5.2. Análise electroforética por SDS-PAGE

Todos os processos electroforéticos de SDS-PAGE foram de acordo com o método de Laemmli (1970), utilizando o equipamento da Biorad®. O gel foi polimerizado com 1 mm de espessura, usando 5% de acrilamida para o gel de empilhamento 12,5% no gel de separação, seguindo o protocolo de polimerização da Tabela 6.

Dependendo do procedimento as amostras poderiam sofrer redução com a adição de  $\beta$ -mercaptoetanol e submetidas a 100 °C por 5 minutos, de modo a quebrar as pontes dissulfeto intramoleculares, assim:

- As amostras quando preparadas em condições redutoras, foi usado tampão Tris-HCl (Sigma-Aldrich®) 125 mM pH 6,8, SDS 140 mM, glicerol 20%, azul de bromofenol 0,03mM, contendo  $\beta$ -mercaptoetanol 0,1 M na proporção de 1:1, no qual as amostras eram posteriormente aquecidas a 100 °C por 5 minutos.
- Quando preparadas sem condições redutoras, foi usado tampão Tris-HCl (Sigma-Aldrich®) 125 mM pH 6,8, SDS 140 mM, glicerol 20%, azul de bromofenol 0,03 mM, no qual as amostras eram aplicadas directamente no gel.

A migração das proteínas no gel de separação foi realizada em corrente fixa a 17 mA, a temperatura ambiente, até a marca azul do tampão de amostra alcançar a porção mais baixa do vidro. Como marcadores de massa molecular foi utilizado *kit* de calibração LMW (*Low Mass Weight*)<sup>41</sup> para SDS-PAGE (GE Healthcare®) composto por: fosforilase B (97 kDa), albumina bovina (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa), anidrase carbónica (30 kDa), inibidor de tripsina de soja (20 kDa) e lactoalbumina (14 kDa).

A revelação do gel era feita ou por *Coomassie Brilliant Blue*® R-250 (Sigma-Aldrich®), sendo posteriormente descorado numa solução descorante de ácido acético (Synth®) 10% e metanol (Synth®) 50%; ou por nitrato de prata (Plat-Lab®), seguindo o protocolo do laboratório. A escolha do método dependia da concentração proteica usada ou da sensibilidade requerida, sendo que o nitrato de prata é 50 a 100 vezes mais sensível que o *Coomassie*.

Após revelação os géis foram foto-documentados no Chemidoc MP (BioRad®).

---

<sup>41</sup> Do inglês - baixa massa molecular

Tabela 6 - Protocolo de polimerização de SDS-PAGE para dois géis com 1 mm de espessura usando o equipamento da Biorad®.

Soluções	Gel de separação 12,5% (mL)	Gel de empilhamento 5% (mL)
Acrilamida (Merck Millipore®)	4,165	0,625
Tris-HCl ( <i>Sigma-Aldrich</i> ®) 0,5 M pH 6,8	-	0,935
Tris-HCl ( <i>Sigma-Aldrich</i> ®) 1,5 M pH 8,8	2,5	-
SDS (USB®) 10%	0,1	0,0375
Água mQ	3,2	2,13
TEMED <sup>42</sup> (USB™)	0,01	0,00875
Persulfato de amónio (Synth®) 10%	0,1	0,0375

### 3. Resultados e Discussão

Os ensaios estão agrupados inicialmente pelos ensaios preliminares feitos ao veneno bruto e posteriormente em purificação, identificação e sequenciação proteica e por fim a caracterização biológica e bioquímica da proteína em estudo. De realçar ainda o facto de muitos destes ensaios terem sido levados a cabo em paralelo, bem como a interpretação dos seus resultados, levando ao aprimoramento das técnicas até chegar aos resultados obtidos.

#### 3.1. Ensaaios preliminares do veneno Bruto

##### 3.1.1. Dosagem e rendimento proteico do veneno bruto

Após extracção e processamento do veneno obtido no laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan foi calculada com um  $r^2=0,996$ , conforme os pontos 2.1 e 2.5.1.1 do Material e Métodos, a concentração proteica da solução em aproximadamente 4,145 µg/µL. Através de proporcionalidade matemática é possível aferir que a solução liofilizada do veneno representa um rendimento proteico de aproximadamente 88,2%.

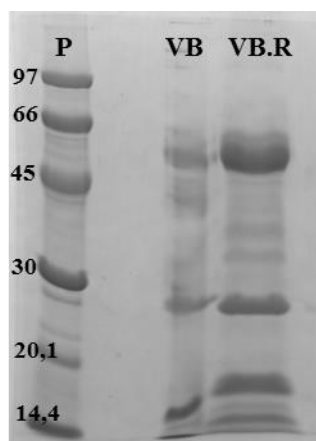
##### 3.1.2. Avaliação do perfil proteico do veneno bruto

###### 3.1.2.1. Por electroforese SDS-PAGE

Na Figura 12 pode observar-se o perfil proteico do veneno bruto num gel SDS-PAGE com e sem redução, obtido a partir de 15 µg de veneno (ponto 2.5.2 do Material e Métodos).

<sup>42</sup> N,N,N',N'-Tetrametil etilenodiamina

Figura 12 – Gel SDS-PAGE do VB com e sem redução.

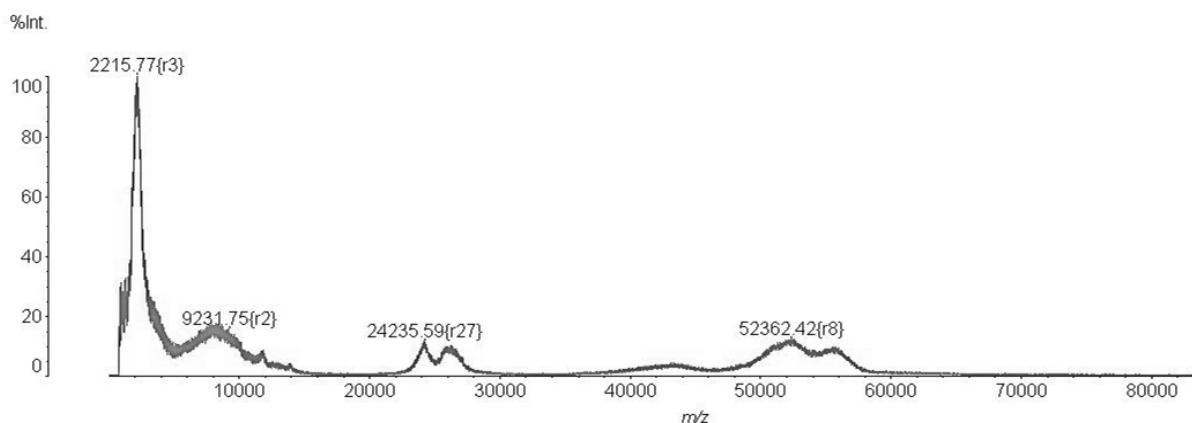


A coluna P representa o padrão de massa molecular, a coluna VB representa o veneno bruto e a coluna VB.R representa o veneno bruto com redução. A numeração que ladeia/sobrepõe as bandas representa a massa molecular do padrão em KDa.

### 3.1.2.2. Com recurso a MALDI-TOF

Na figura 13 apresenta-se a representação gráfica das massas moleculares das proteínas presentes no veneno bruto após análise MALDI-TOF Axima Performance (Shimadzu Corporation®) (o ponto 2.3.3 dos Material e Métodos).

Figura 13 – Representação gráfica da massa molecular das proteínas presentes no VB com recurso ao MALDI-TOF.



### 3.1.3. Discussão

Com base nas Figura 12 e Figura 13 é possível observar que os componentes maioritários deste veneno centram-se entre os 60 e os 45 KDa, entre os 30 e os 20 KDa e abaixo dos 20 KDa. A banda com aproximadamente 45 KDa só é visível na forma não reduzida, enquanto outras bandas são apenas visíveis nas amostras que sofreram redução. Esta questão prende-se com o facto das proteínas poderem ser compostas por várias cadeias polipeptídicas que,

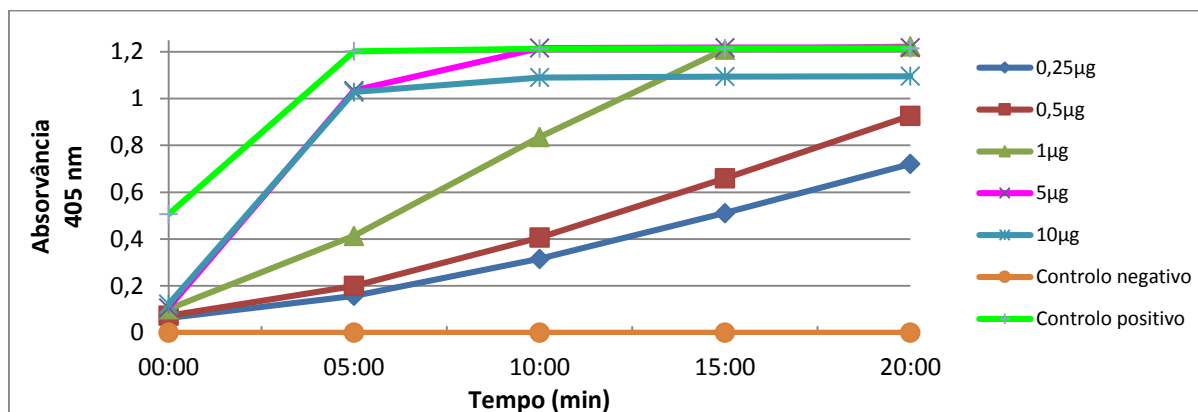
quando fraccionadas nas suas pontes dissulfeto, geram produtos de degradação (cadeias mais leves).

### 3.1.4. Estudo de activação do veneno bruto

#### 3.1.4.1. Activação da protrombina

Na Figura 14 pode observar-se a representação gráfica dos resultados dos ensaios de activação da protrombina quando utilizadas diferentes quantidades de veneno bruto (0.25, 0.5, 1, 5, 10  $\mu\text{g}$ )

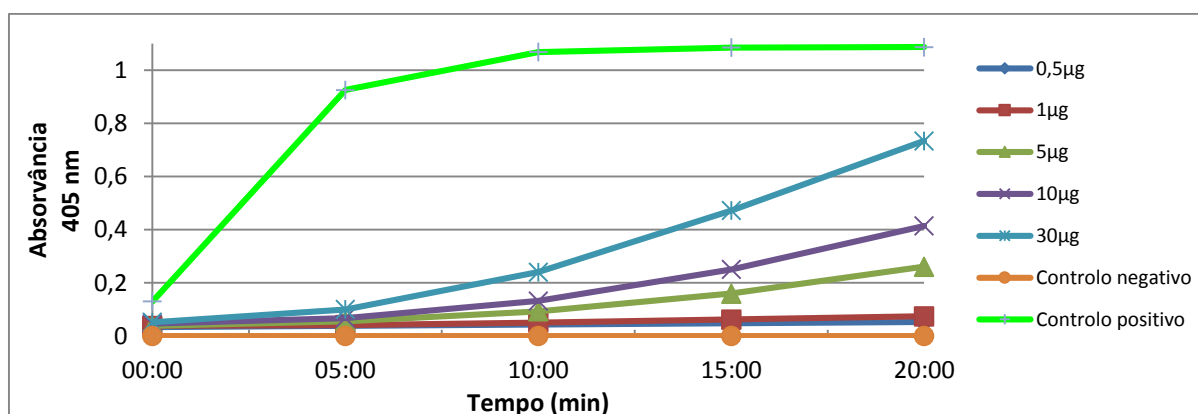
Figura 14 – Gráfico da activação da protrombina a diferentes concentrações de VB.



#### 3.1.4.2. Activação do FX

Na Figura 15 pode observar-se a representação gráfica dos resultados dos ensaios de activação do FX quando utilizadas diferentes quantidades de veneno bruto (0.5, 1, 5, 10, 30  $\mu\text{g}$ ).

Figura 15 - Gráfico da activação do FX a diferentes concentrações de VB.



### 3.1.5. Discussão

Com base no conhecimento prévio de que o veneno continha um activador de protrombina, previamente caracterizado neste laboratório (*berylthactivase*), e um possível activador de FX (M. B. Silva *et al.*, 2003), procedeu-se, a um ensaio de activação de protrombina e do FX, de modo a confirmar esta informação, nas nossas condições experimentais. Dado que a

quantidade de veneno necessário para que pudesse ocorrer uma reacção de activação era desconhecida, foram usadas várias concentrações para avaliar o efeito dose/resposta.

Como se pode observar nas Figura 14 e Figura 15 houve de facto actividade para ambas as enzimas. Os resultados mostram ainda que em ambos os testes a concentração proteica é proporcional à velocidade da reacção, ou seja, quanto mais elevada a concentração de proteína mais rapidamente ocorre a saturação do substrato (*plateau* do gráfico).

No que diz respeito ao teste da protrombina (Figura 14) a partir de 1µg de veneno já é possível visualizar a saturação de substrato em 20 minutos de reacção.

Em relação à activação do FX (Figura 15) esta ocorre com um perfil semelhante ao ensaio anterior, contudo de forma menos acentuada, nunca atingindo a saturação do substrato no tempo de reacção. Isto pode dever-se ao factor do extracto bruto ser pobre em enzimas activadoras de FX relativamente ao total conteúdo proteico.

### **3.2. Purificação**

A purificação decorreu em três fases uma primeira em que se utilizou a cromatografia de filtração em gel para separação e colheita das várias fracções e posterior análise, uma segunda fase que após vários aprimoramentos permitiu obter uma fracção pura e por último uma cromatografia de fase reversa para verificar a pureza da fracção de interesse. As alterações ao método introduzidas e sua fundamentação serão discutidos no ponto 3.2.2.

#### **3.2.1. Cromatografia de filtração em gel e Electroforese SDS-PAGE**

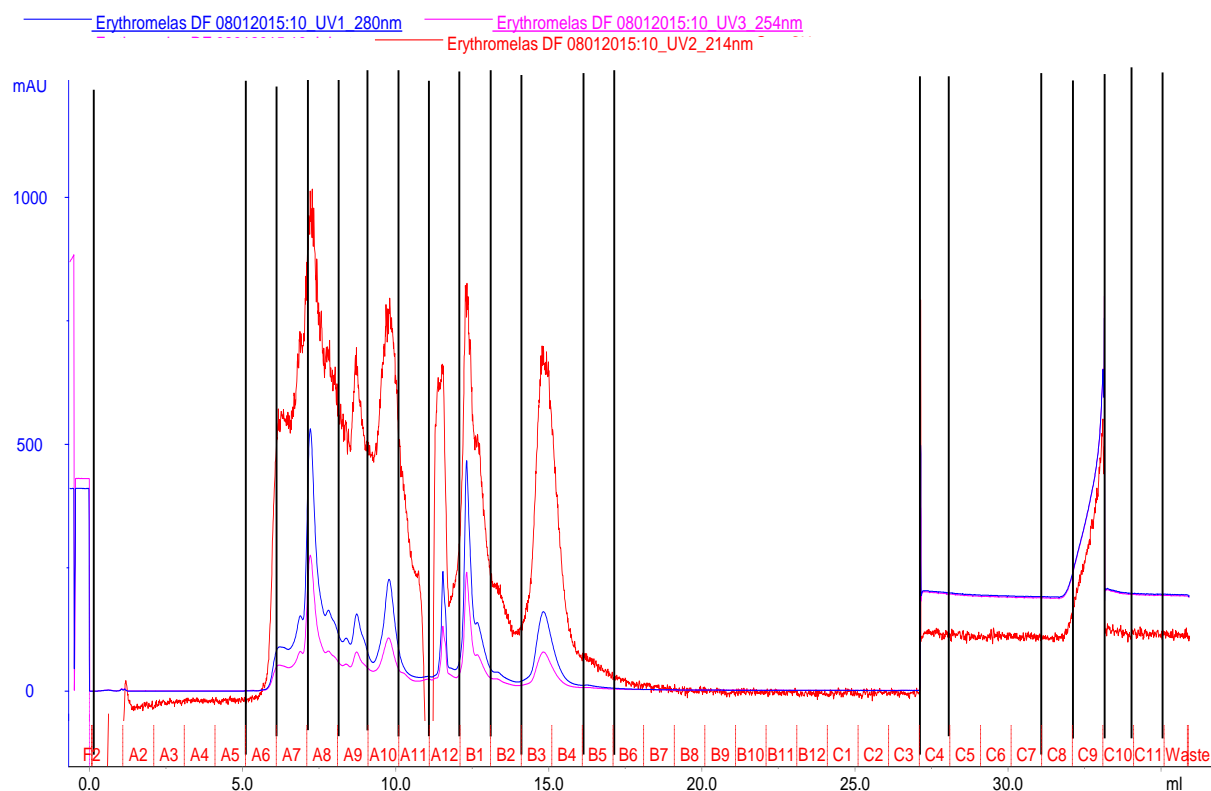
A purificação da proteína de interesse do veneno bruto procedeu-se com recurso a uma cromatografia de filtração em gel (ponto 2.2.1 do Material e Métodos) originando o cromatograma apresentado na Figura 16, tendo sido colhidas 19 fracções correspondentes aos picos observados no perfil proteico em A 280 nm (traço azul) (A1-A5, A6, A7, A8, A9, A10, A11, A12, B1, B2, B3-B4, B5, B6-C3, C4, C5-C7, C8, C9, C10 e C11).

A dosagem proteica requer uma quantidade apreciável de amostra e dado que a concentração proteica de muitas das fracções poderia estar abaixo do limiar de detecção do ensaio de quantificação proteica (BCA)<sup>43</sup>, optou-se por não a realizar.

---

<sup>43</sup> Na altura que este ensaio decorreu o laboratório ainda não dispunha do equipamento NanoDrop 2000 (Thermo Scientific®).

Figura 16 – Representação gráfica da cromatografia de filtração em gel TSKgel G2000SW (Tosoh BioScience®).

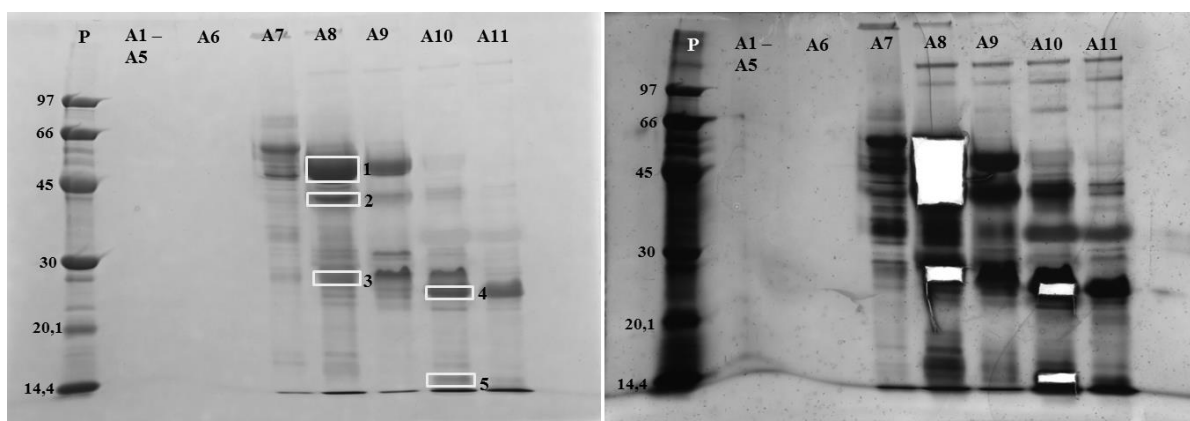


O eixo das ordenadas representa a absorvância em miliunidade de absorvância (mAU) e o eixo das abcissas representa o volume de amostra em mililitros. A absorvância a 280 nm está ilustrada com traço azul, a absorvância a 254 nm está ilustrada a traço cor-de-rosa, a absorvância a 214 nm está ilustrada a traço vermelho.

O perfil proteico e a pureza das fracções colectadas, foram avaliados através de electroforese SDS-PAGE sem redução (ponto 2.5.2 do Material e Métodos) utilizando as duas técnicas de coloração.

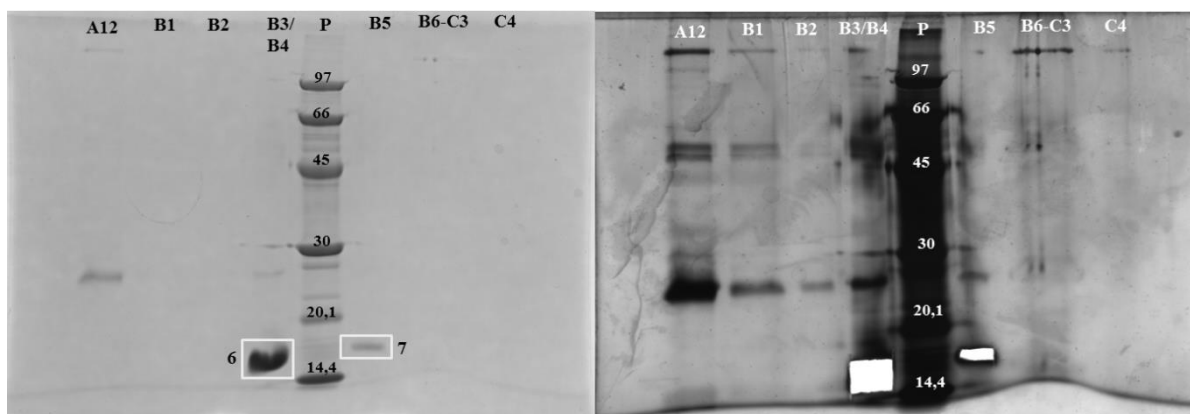
Todas as fracções foram analisadas sendo os resultados das electroforeses apresentados na Figura 17 (fracções A1 a A11), Figura 18 (fracções A12 a C4) e Figura 19 (fracções C5 a C11) podendo nesta última observar-se também os resultados obtidos para o veneno bruto (VB). Nas figuras a coluna P representa o padrão de massa molecular e a numeração que ladeia/sobrepõe as bandas representa a massa molecular do padrão em KDa. Os rectângulos delimitados a amarelo nas figuras do gel corado pela técnica de Coomassie Brilliant Blue® R-250 (Sigma-Aldrich®) indicam as bandas recortadas para digestão *in gel* para posterior identificação por espectrometria de massa e respectivo número identificativo.

Figura 17 - Gel SDS-PAGE (1/3) das fracções da cromatografia de filtração em gel TSKgel G2000SW (Tosoh BioScience®) (A1 a A11).



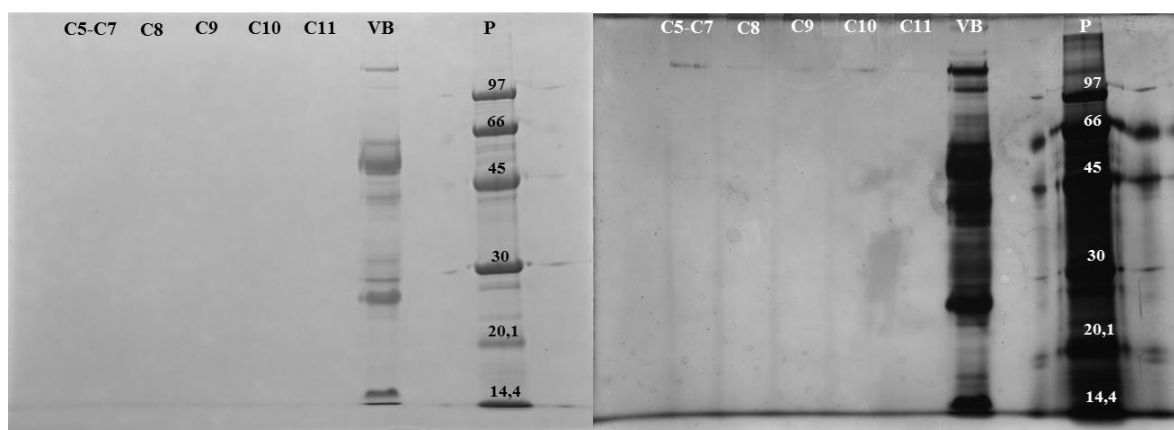
À esquerda encontra-se o gel corado por Coomassie Brilliant Blue® R-250 (Sigma-Aldrich®) e à direita o mesmo gel corado por nitrato de prata (Plat-Lab®). Dentro das caixas encontram-se evidenciadas as bandas que foram recortadas para espectrometria de massa e sua respectiva identificação. A coluna P representa o padrão de massa molecular e a numeração que ladeia/sobrepõe as bandas representa a massa molecular do padrão em KDa.

Figura 18 - Gel SDS-PAGE (2/3) das fracções da cromatografia de filtração em gel TSKgel G2000SW (Tosoh BioScience®) (A12 a C4).



À esquerda encontra-se o gel corado por Coomassie Brilliant Blue® R-250 (Sigma-Aldrich®) e à direita o mesmo gel corado por nitrato de prata (Plat-Lab®). Dentro das caixas encontram-se evidenciadas as bandas que foram recortadas para espectrometria de massa e sua respectiva identificação. A coluna P representa o padrão de massa molecular e a numeração que ladeia/sobrepõe as bandas representa a massa molecular do padrão em KDa.

Figura 19 - Gel SDS-PAGE (3/3) das fracções da cromatografia de filtração em gel TSKgel G2000SW (Tosoh BioScience®) (C5 a C11) e veneno bruto (VB).



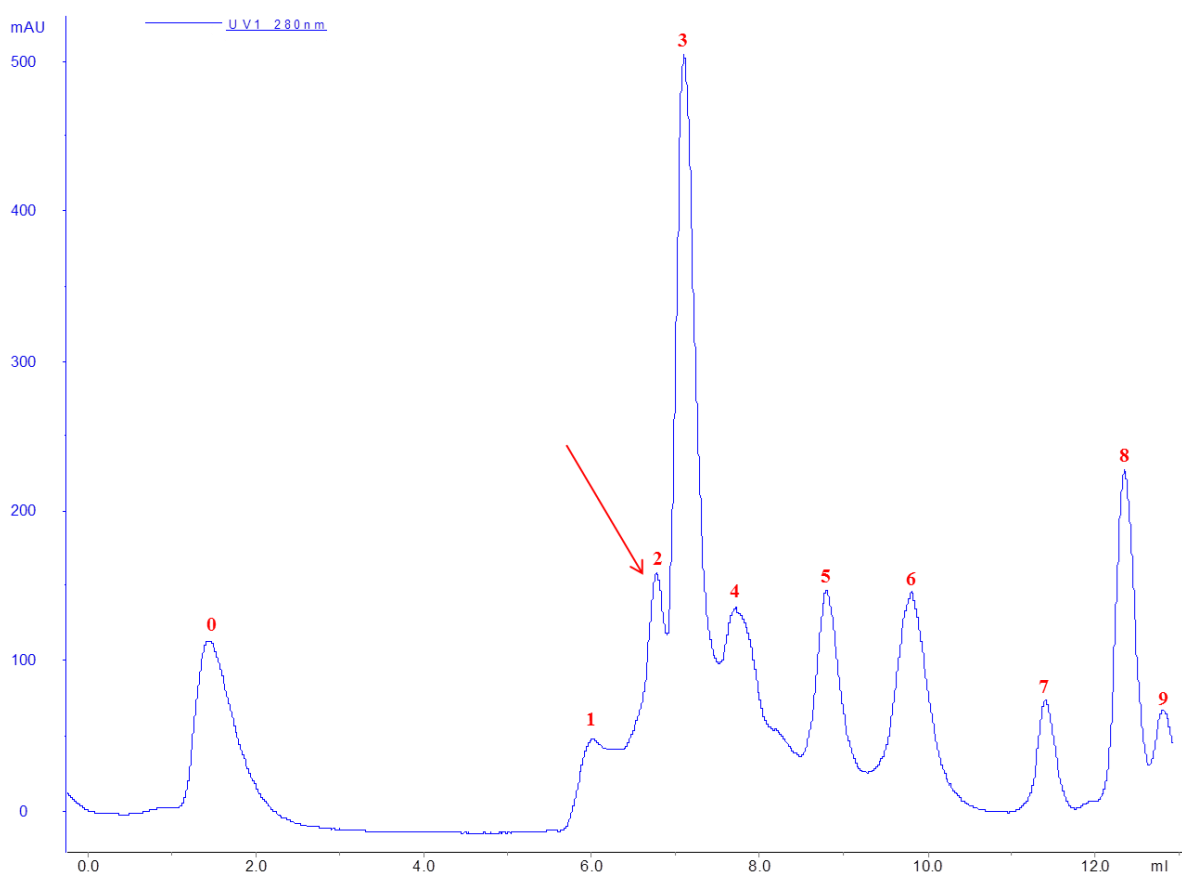
À esquerda encontra-se o gel corado por Coomassie Brilliant Blue® R-250 (Sigma-Aldrich®) e à direita o mesmo gel corado por nitrato de prata (Plat-Lab®). A coluna P representa o padrão de massa molecular e a numeração que ladeia/sobrepe as bandas representa a massa molecular do padrão em KDa.

### 3.2.2. Cromatografia de filtração em gel e Electroforese SDS-PAGE - alteração ao método

Num período temporal ulterior, após análise de resultados das fases subsequentes, foi considerado que os resultados poderiam ser substancialmente melhores com algumas alterações da técnica cromatográfica de separação e colheita das fracções. As alterações introduzidas (ponto 2.2.1.1) levaram ao traçado cromatográfico que se apresenta na Figura 20, tendo sido identificados dez picos, sendo o que representa a proteína de interesse identificado com o algarismo 2. O primeiro pico foi descartado dado que é uma fracção que vem usualmente bastante contaminada (fracção 0).



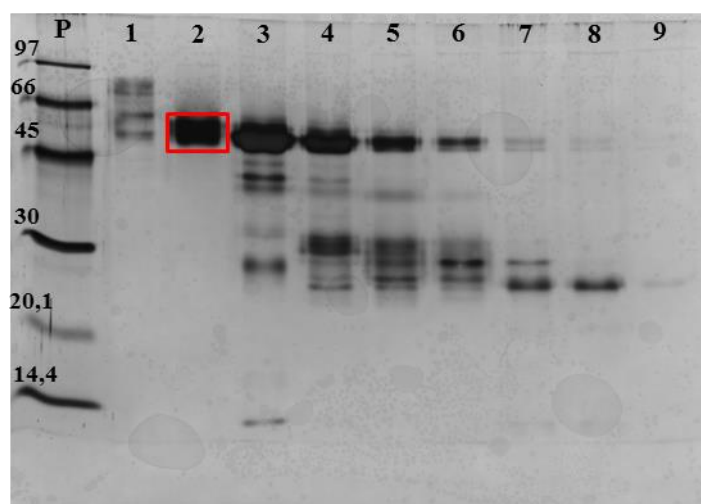
Figura 20 - Representação gráfica da cromatografia de filtração em gel TSKgel G2000SW (Tosoh BioScience®) – alteração ao método.



O eixo das ordenadas representa a absorvância em miliunidade de absorvância (mAU) e o eixo das abcissas representa o volume de amostra em mililitros. A absorvância a A 280 nm está ilustrada com traço azul. A numeração nos picos indica as fracções colectadas e a seta evidencia o pico onde foi eluída a proteína de interesse.

Para avaliar o perfil proteico e a pureza das fracções foi, tal como anteriormente, realizada uma electroforese SDS-PAGE (ponto 2.5.2 do Material e Métodos). Na Figura 21 apresenta-se a imagem do gel corado por nitrato de prata e a banda utilizada posteriormente para identificação por espectrometria de massa.

Figura 21 - Gel SDS-PAGE das fracções da cromatografia de filtração em gel TSKgel G2000SW (Tosoh BioScience®) (1 a 9) – alteração ao método.

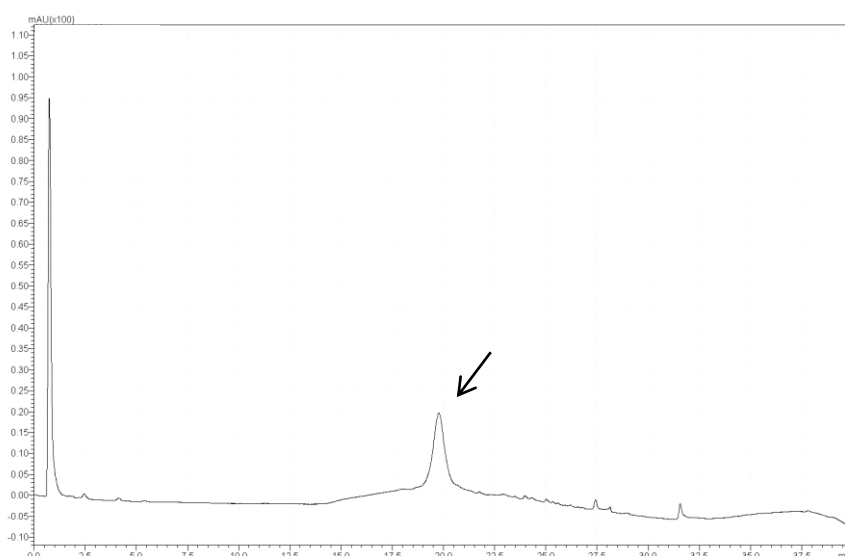


Gel SDS-PAGE corado por Coomassie Brilliant Blue® R-250 (Sigma-Aldrich®). Dentro da caixa encontra-se evidenciada a banda para espectrometria de massa. A coluna P representa o padrão de massa molecular e a numeração que ladeia/sobrepõe as bandas representa a massa molecular do padrão em kDa.

### 3.2.3. Cromatografia de fase reversa C4

Os resultados obtidos na Electroforese feita a partir das fracções colhidas seguindo o método cromatográfico modificado, permitiram seleccionar a fracção 2 como a proteína de interesse, sendo necessário verificar a sua pureza antes de prosseguir para os ensaios de caracterização, tendo para isso sido realizada uma cromatografia de fase reversa (ponto 2.2.2 do Material e Métodos) cujo cromatograma é apresentado na Figura 22.

Figura 22 – Representação gráfica da cromatografia de fase reversa C4 (apHera™ - Sigma-Aldrich®).



O eixo das ordenadas representa a absorvância em miliunidade de absorvância vezes 100 (mAUx100) e o eixo das abcissas representa o volume de amostra em mililitros. A absorvância a 280 nm está ilustrada com traço preto. A seta evidencia o pico onde foi eluída a proteína de interesse.

### 3.2.4. Discussão

A primeira abordagem para purificar a proteína de interesse foi a realização de uma cromatografia de troca catiónica com a coluna Resource S (GE Healthcare®), usando um protocolo de separação previamente usado por M. B. Silva *et al.* (2003) com este veneno. Contudo os resultados deste método não foram ao encontro dos resultados encontrados na literatura, não promovendo uma separação eficaz das proteínas. De modo a descartar possíveis problemas com a coluna realizou-se uma nova cromatografia de troca catiónica mas utilizando outra coluna catiónica, a Metasil SCX (Phenomenex®), tendo os resultados obtidos mostrado ser igualmente ineficaz na separação dos componentes deste veneno. Com base nestes dois resultados<sup>44</sup> pode-se colocar a hipótese de que as proteínas terão na sua maioria carga positiva, o que de certa forma vai contra os resultados de M. B. Silva *et al.* (2003), que obteve resultados positivos usando uma coluna catiónica.

O grupo de investigação decidiu então adoptar uma nova estratégia cromatográfica usando uma coluna de filtração em gel TSKgel G2000SW (Tosoh BioScience®). Foram feitos vários ensaios com esta coluna de modo a refinar a separação proteica tanto em sistema de cromatografia líquida como em sistema de cromatografia líquida de alta eficiência.

Do ensaio inicial com a coluna de filtração em gel (ponto 3.2.1 do Resultados e Discussão) as fracções ainda se encontram muito contaminadas (ver Figura 17, Figura 18 e Figura 19), especialmente as primeiras fracções que, ao contrário do que era esperado, possuem moléculas com valores de massa molecular bastante variada. A escolha de corar os géis por nitrato de prata, depois de terem sido corados por Coomassie Brilliant Blue® R-250 (Sigma-Aldrich®), tem a ver com a sensibilidade da coloração, permitindo deste modo visualizar bandas que de outra forma não eram possíveis de visualizar. Isto porque foi possível obter actividade de activação do FX<sup>45</sup> em fracções que, aparentemente, não continham bandas proteicas (como por exemplo a fracção B1 da Figura 18). Ainda que este ensaio não tenha permitido obter a fracção pura, permitiu, através da análise de espectrometria de massa das bandas colhidas do gel SDS-PAGE, ter uma ideia da composição dos principais constituintes do veneno (ver ponto 3.3.1.1).

O segundo ensaio com a técnica cromatográfica de filtração em gel (método modificado) surge quando quer os resultados do primeiro ensaio quer os das fases subsequentes

---

<sup>44</sup> A metodologia e resultados destes ensaios, realizados durante a execução do desenho experimental inicial, não foram introduzidos no texto de modo a mantê-lo o mais perceptível possível.

<sup>45</sup> Os resultados destes ensaios, realizados durante o refinamento do desenho experimental, não foram introduzidos no texto de modo a mantê-lo o mais perceptível possível.

nomeadamente os ensaios de activação do FX e da protrombina<sup>46</sup>, mostraram não só que as amostras apresentavam apreciável contaminação (entendida como a existência de uma mistura de compostos e não apenas de um) como a percepção de que as proteínas responsáveis por activar o FX e a protrombina se encontram acima dos 30 KDa.

A alteração da metodologia permitiu assim melhorar a definição do traçado cromatográfico (Figura 20), observando-se na Figura 21 que é a fracção 2 em causa que apresenta apenas uma banda isolada entre os 66 e os 45 KDa.

A cromatografia de fase reversa (Figura 22) confirmou a pureza da fracção, que apresenta um só pico. Este passo é essencial pois as técnicas de caracterização requerem um elevado grau de pureza.

A fase de purificação foi rica em dificuldades sendo necessário, como ficou expresso, voltar diversas vezes ao ponto inicial de separação. Estas dificuldades podem ter sido devidas à formação de complexos entre as proteínas graças a interacções não covalentes (Thakur, Chattopadhyay, & Mukherjee, 2015). Outro dos problemas nesta fase foi a obtenção de concentrações muito baixas de proteína aquando das cromatografias, o que poderia dever-se à distribuição da proteína de interesse por várias fracções (contaminando-as) e/ou ao facto da proteína de interesse poder ser um componente minoritário no veneno bruto.

### **3.3. Identificação e sequenciação proteica**

Com base nos resultados da purificação começou-se a identificação proteica de modo a saber a identidade e a natureza desta proteína, bem como garantir que não estaríamos perante uma proteína já descrita, nomeadamente a *berylthractivase*. Em paralelo foram igualmente feitos ensaios de caracterização para saber se esta proteína era responsável pela activação do FX.

#### **3.3.1. Identificação proteica por Espectrometria de massa**

##### **3.3.1.1. Perfil geral do veneno**

As sete bandas obtidas na electroforese SDS-PAGE (ponto 3.2.1, Figura 17 e Figura 18), foram submetidas a análise no espectrómetro de massa (ponto 2.4.1 do Material e Métodos) e os resultados comparados com bibliotecas existente com recurso a *softwares* de bioinformática (ponto 2.4.3 do Material e Métodos). Na Tabela 7, está descrita, para cada banda analisada por espectrometria de massa, o nome da proteína à qual o fragmento do ensaio teve correspondência e o seu número de identificação (número de acesso).

---

<sup>46</sup> Os resultados destes ensaios, realizados durante o refinamento do desenho experimental, não foram introduzidos no texto de modo a mantê-lo o mais perceptível possível.

Tabela 7 – Identificação proteica das bandas das Figura 17 e Figura 18 por espectrometria de massa.

Banda	Número de acesso	Nome
1	Q8QG88 VM36A_BOTIN	Zinc metalloproteinase-disintegrin-like
	V8PFZ4 V8PFZ4_OPHHA	ATP-dependent RNA helicase
2	Q8QG88 VM36A_BOTIN	Zinc metalloproteinase-disintegrin-like
	H9GFT5 H9GFT5_ANOCA	Uncharacterized protein
3	B0VXT6 B0VXT6_SISCA	Serine proteinase isoform 4
	G1KD51 G1KD51_ANOCA	Uncharacterized protein
	V8P3W4 V8P3W4_OPHHA	Liprin-alpha-2 (Fragment)
4	Q8QG89 VM1B_BOTIN	Snake venom metalloproteinase
	Q072L6 VSPL_BOTAS	Thrombin-like enzyme asperase
	P31989 VM2JC_BOTJA	Zinc metalloproteinase/disintegrin (Fragment)
	Q2UXQ4 Q2UXQ4_ECHOC	Group III snake venom metalloproteinase
5	-	-
6	Q6T5K9 Q6T5K9_GLOSH	Acidic phospholipase A2 (Fragment)
	I2DAL4 I2DAL4_9SAUR	Acidic secretory phospholipase A2 sPLA2
	T2HPH7 T2HPH7_OVOOK	Phospholipase A2
7	-	-

### 3.3.1.2. Proteína isolada

Após a modificação da técnica cromatográfica de filtração em gel (ponto 3.2.2 dos Resultados e Discussão) e verificação da pureza por cromatografia de fase reversa C4 (ponto 3.2.3 dos Resultados e Discussão), a banda obtida na electroforese (Figura 21) correspondente à fracção 2 da cromatografia (Figura 20) foi processada (2.4.1.1 do Material e Métodos) de modo a ser possível fazer a sua sequenciação através de espectrometria de massa (2.4.1 do Material e Métodos). Esta sequenciação tem por objectivo perceber se a fracção de interesse é uma molécula já descrita, nomeadamente a *berythractivase*.

Os resultados da sequenciação foram comparados com bibliotecas existentes de acordo com o ponto 2.4.3 do Material e Métodos.

Figura 23 – Alinhamento das sequências do *bothropasin* e da *beryrthractivase*.

[illegible]

As áreas evidenciadas representam as sequências identificadas pelo espectrómetro de massa da proteína de interesse. O alinhamento foi feito com recurso ao programa CLUSTAL OMEGA<sup>47</sup>.

### 3.3.2. Sequenciação de aminoácidos pela técnica de degradação de *Edman*

A proteína isolada durante a cromatografia de fase reversa C4 (ponto 3.2.3 dos Resultados e Discussão) foi submetida à técnica de degradação de *Edman* (ponto 2.4.2 do Material e Métodos) para sequenciação de aminoácidos.

A sequência obtida foi NH<sub>3</sub>-E-N-N-N-N-N-N-N-N-COOH.

<sup>47</sup> Disponível em <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>.

### 3.3.3. Discussão

Através da análise da Tabela 7 é possível verificar que a composição do veneno é, em maioria, composto por metaloproteases, serina endopeptidases e fosfolipases A2.

A grande quantidade de correspondências com metaloproteases eleva a possibilidade da proteína em estudo pertencer a esta família de proteínas. A falta de sequências genómicas de serpentes, bem como a rápida evolução divergente nas sequências aminoácidas das proteínas das serpentes contribui para que algumas das proteínas não sejam passíveis de serem identificadas e isso é um desafio na identificação de novas proteínas (como é o caso da banda 5 e 7). Contudo o facto de muitas possuírem domínios homólogos entre si facilita a identificação, pelo menos, da classe proteica.

A comparação efectuada através do *PEAKS software*<sup>®</sup> na Figura 23 revelou que a fracção de interesse era semelhante a uma proteína já caracterizada (*bothropasin* da serpente *Bothrops jararaca*) pelas sequências peptídicas obtidas serem idênticas às encontradas nesta proteína (realçados a cinzento na Figura 23). É possível verificar que, apesar de semelhantes, estas sequências não se encontram na sequência da *beryrthactivase*, não podendo, por isso estarmos presente essa proteína.

Este *software* assim como o *MASCOT (Matrix Science)* faz uma comparação dos resultados com bases de dados pré-existent (nrNCBI e a do laboratório) de espectros e sequências de péptidos, usando uma pontuação probabilística para a sua identificação. Porém o *PEAKS software*<sup>®</sup> usa outro algoritmo de busca, o que pode dar outros resultados, também confiáveis, para a identificação de proteínas. Esse *software* prevê também modificações pós-traducionais e substituições de aminoácidos, então se houver alguma isoforma, o que é muito comum em toxinas, esta poderá ser identificada. Com este *software*, é ainda possível fazer uma sequenciação de novo e busca dessa sequência em bases de dados.

Como se pode observar apesar de semelhantes não se trata da *beryrthactivase* pois essa proteína não contém as sequências obtidas no procedimento supracitado. Deste procedimento, e dada a semelhança com as proteínas da família das zinco-metaloproteases, pode-se suspeitar que a proteína de interesse pertença à mesma família. Contudo não foi encontrado nenhum marcador específico da família.

Da interpretação dos resultados obtidos no ensaio de sequenciação por degradação de *Edman* (ponto 3.3.2 dos Resultados e Discussão) é possível dizer que o resultado representa um artefacto. Esta interpretação é baseada nos picos obtidos durante o ensaio e também pela própria sequência em si. Esta técnica foi efectuada novamente na tentativa de sequenciar a proteína, contudo sem sucesso. Isto pode ter ocorrido devido a algum contaminante não

proteico que pudesse estar presente na amostra ou pela possibilidade desta proteína ter o N-terminal bloqueado, impossibilitado assim a sua sequenciação.

Com base nos resultados de identificação podemos concluir que a proteína em estudo não é a *berythractivase* ou outra proteína descrita até ao momento e que muito provavelmente pertence à família das zinco-metaloproteases.

### 3.4. Caracterização biológica e bioquímica

Após a fase de Purificação a fracção purificada foi sujeita a diversos ensaios que permitissem a sua caracterização biológica e bioquímica em paralelo com a sua identificação e sequenciação.

#### 3.4.1. Doseamento proteico

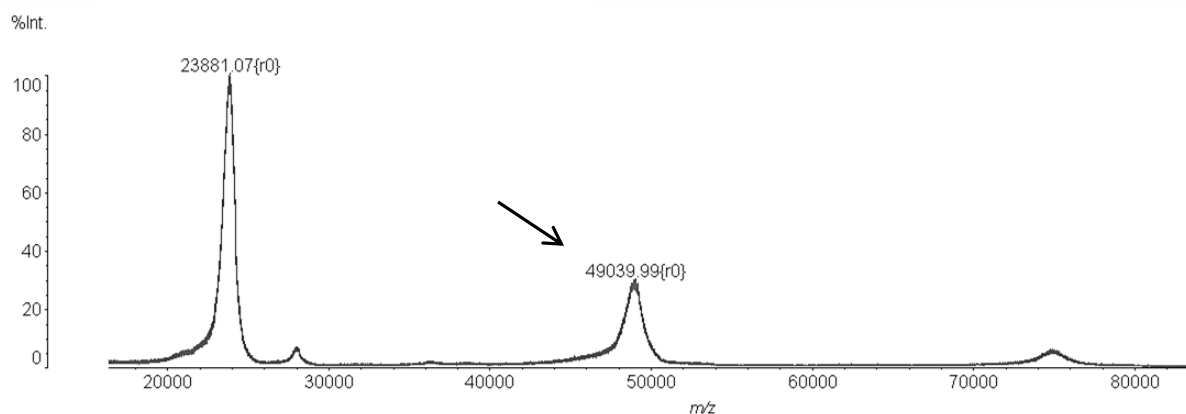
A fracção pura foi doseada segundo o ponto 2.5.1.2 do Material e Métodos. A concentração proteica determinada foi de 1,5 µg/µL.

#### 3.4.2. Determinação da massa molecular

Durante os ensaios de purificação e com base na Figura 21 é possível ver que a massa molecular situa-se entre os 66 e os 45 KDa. Contudo a utilização de análise espectrométrica de massa por ionização e dessorção a laser assistida por matriz (ponto 2.3.3 do Material e Métodos) permitiu determinar a massa molecular específica da proteína.

Na representação gráfica da determinação da massa molecular (Figura 24) estão presentes 4 picos estando assinalado o que representa a massa molecular da proteína em estudo (49039 Da.). A relevância dos restantes picos será abordada durante a discussão.

Figura 24 - Representação gráfica da massa molecular da proteína presente na fracção da cromatografia de fase reversa C4 (apHera™ - Sigma-Aldrich®) com recurso ao MALDI-TOF.



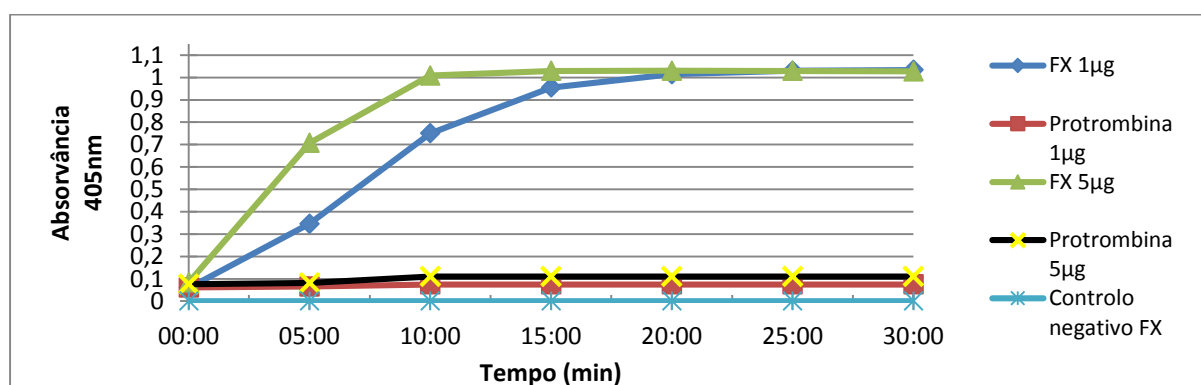


### 3.4.2.1. Estudo de Activação do FX e da protrombina na proteína em estudo

De modo a verificar se a proteína em estudo activa o FX e a protrombina foi efectuado um ensaio de activação (pontos 2.3.1.1 e 2.3.1.2 do Material e Métodos), tendo sido utilizado 1 e 5  $\mu\text{g}$  de proteína.

Como é possível observar na Figura 25 a proteína em estudo tem uma actividade bastante alta, mesmo em baixas concentrações, sendo bastante eficiente na proteólise do FX. No que diz respeito à activação da protrombina a proteína em estudo não teve capacidade de activar esta enzima, sendo equiparada ao controlo negativo da reacção.

Figura 25 - Gráfico da activação do FX e da protrombina da proteína em estudo.



### 3.4.3. Estudo de inibição

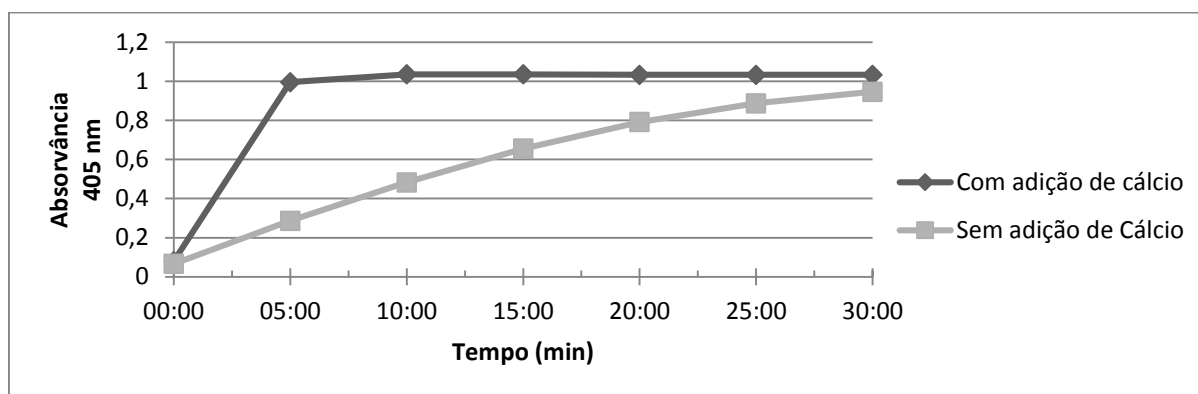
Com base nos resultados obtidos na espectrometria de massa e nos resultados de activação, procedeu-se a ensaios de activação de FX com inibidores selectivos para as metaloproteases (EDTA), para cisteína-proteases (E-64) e para serina endopeptidases (PMSF), com o intuito de perceber qual a classe da proteína activadora de FX e se por acaso existiria mais do que uma classe de enzima capaz de activar o FX.

#### 3.4.3.1. Acção do Cálcio na reacção

O Cálcio pode interferir na reacção de activação, sendo pois necessário perceber se essa interferência é real neste caso. Assim procedeu-se a um teste de activação do FX (2.3.2.2 do Material e Métodos) com veneno bruto (1,37  $\mu\text{g}$ ) num ambiente sem adição de cálcio que é normalmente utilizado no tampão dos ensaios de activação.

Como é possível observar no resultado deste ensaio (Figura 26) quando o cálcio não é adicionado à reacção a actividade ocorre muito mais lentamente.

Figura 26 - Gráfico da activação do FX do VB com e sem adição de cálcio.

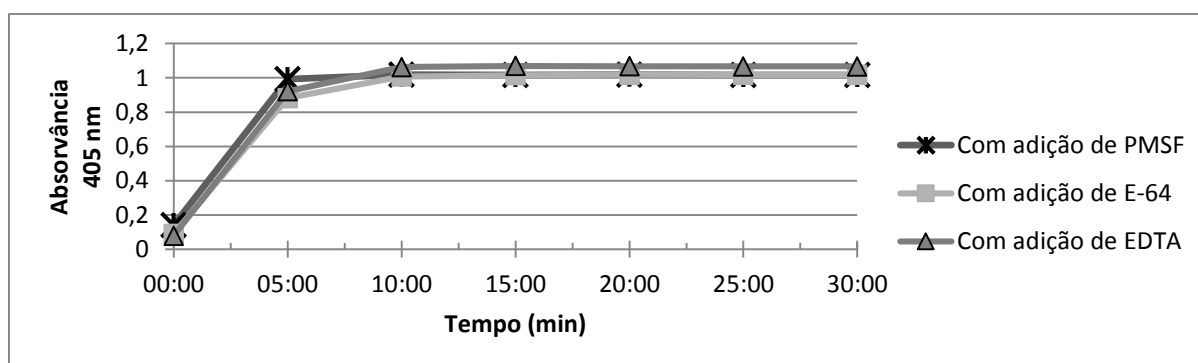


### 3.4.3.2. Efeito dos inibidores no veneno bruto

Os testes de activação do FX com o veneno bruto foram realizados com os inibidores PMSF, E-64 e EDTA (ponto 2.3.2.1 do Material e Métodos).

Ao contrário do que era esperado não houve inibição por nenhum dos inibidores, como se pode ver na Figura 27.

Figura 27 - Gráfico da activação do FX do VB com adição de PMSF, E-64 e EDTA.

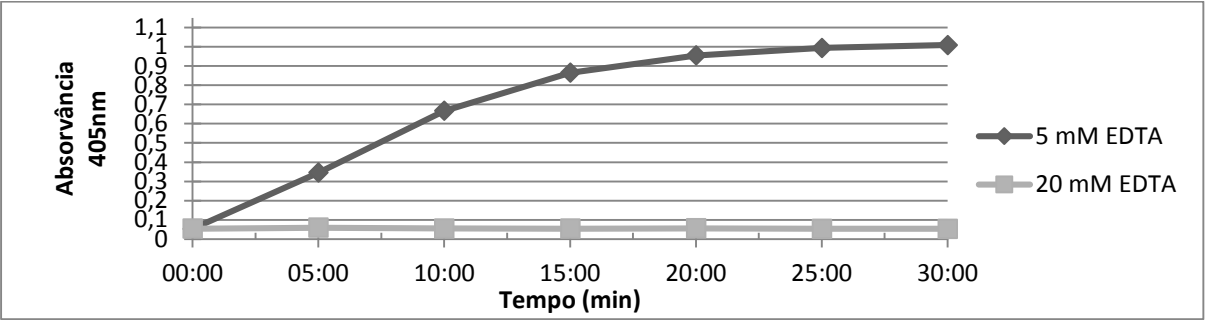


### 3.4.3.3. Efeito dos inibidores na proteína em estudo

Com base em resultados prévios e com o intuito de confirmar a classe da proteína em estudo como sendo uma metaloproteases, e como tal, passível de ser inibida por um quelante de metais, neste caso o EDTA, foi efectuado um ensaio da activação do FX na presença de 5 mM e de 20mM de EDTA e de 1 µg de proteína no volume final da reacção (ponto 2.3.2.1 do Material e Métodos).

Como é possível observar na Figura 28, na concentração de 5 mM de EDTA não houve inibição, mas com a concentração de 20 mM de EDTA (Dinâmica®) houve inibição total da activação do FX.

Figura 28 - Gráfico da activação do FX da proteína de interesse com adição de EDTA (5 mM e 20 mM).



3.4.4. Determinação do ponto de clivagem no FX humano

Os resultados do ensaio para determinação do ponto de clivagem do FX humano (ponto 2.3.4 do Material e Métodos) pela proteína em estudo estão sumarizados na Figura 29.

Como é possível observar na sequência do FX humano, o RVV-X e a proteína em estudo clivam o FX na cadeia pesada, e embora em locais diferentes, produzem ambos FXa biologicamente activo e funcional. O RVV-X cliva o FX na posição Arg<sub>194</sub>-Ile<sub>195</sub> (sendo o mesmo local de clivagem em situações fisiológicas) (S. Takeda *et al.*, 2012) e a proteína em estudo cliva o FX na posição Glu<sub>310</sub>-Ser<sub>311</sub>.

Figura 29 – Determinação do ponto de clivagem da proteína em estudo e do RVV-X na sequência proteica do FX humano.

10	20	30	40	50	60
MGRPLHLVLL	SASLAGLLLL	GESLFIRREQ	ANNILARVTR	ANSFLEEMKN	GHLERECMEE
70	80	90	100	110	120
TCSEEEAREV	FEDSDKTNEF	WNKYKDGDCQ	ETSPCQNQGN	CKDGLGEYTC	TCLEGFEGKN
130	140	150	160	170	180
CELFTKRLCS	LDNGDCDQFC	HEEQNSVVCN	CARGYTLADN	GKACIPTGPV	PCGKQTLERR
190	200	210	220	230	240
KRSVAQATSS	SGEAPDSITW	KPYDAADLDP	TENPFDLLDF	NQTQPERGDN	NLTRIVGGQE
250	260	270	280	290	300
CKDGECPWQA	LLINEENEGF	CGGTILSEFY	ILTAACHLYQ	AKRFKVRVGD	RNTEQEEGGE
310	320	330	340	350	360
AVHEVEVVIK	HNRFTKETVD	FDIAVLRLLK	PITFRMNVAP	ACLPERDWAE	STLMTQKTGI
370	380	390	400	410	420
VSGFGRTHEK	GRQSTRLLML	EVPIVDRNSC	KLSSSFIIITQ	NMFCAGYDTK	QEDACQGDSG
430	440	450	460	470	480
GPHVTRFKDT	YFVTGIVSWG	EGCARKGKYG	YTKVTAFLK	WIDRSMKTRG	LPKAKSHAPE
488					
VITSSPLK					

Sequência proteica do FX humano (UniProt, 2015). Realçado a amarelo é o péptido sinal; a azul claro o pró-péptido; a verde a cadeia leve do FX e a cinzento a cadeia pesada da proteína. A seta realçada a vermelho indica o ponto de clivagem do RVV-X (S. Takeda *et al.*, 2012) e a seta realçada a azul indica o ponto de clivagem da proteína em estudo.

### 3.4.5. Discussão

Dos quatro picos presentes na Figura 24 apenas os dois maiores têm relevância para a interpretação do resultado, sendo que os outros dois menores são desprezíveis podendo resultar de interferência. O facto de aparecerem dois grandes picos neste resultado não quer dizer que se trate de duas proteínas. É muito provável que seja a mesma proteína, isto porque o resultado é dado na razão da massa pela carga adquirida pela molécula durante o ensaio (protonação). Acontece que por vezes as moléculas adquirem duas cargas, assim sendo o resultado apresentado é metade do valor real. Neste caso 23881 Da é aproximadamente metade do valor de 49039 Da, assumindo assim que se trata da mesma molécula, indicando assim uma pureza relativamente alta.

O facto de a proteína ter média/alta massa molecular e pertencer à família das metaloproteases, pressupõe-se que pertença à classe II ou III das SVMP, contudo um estudo mais profundo da proteína seria necessário para confirmar os seus vários domínios.

É interessante notar que a actividade verificada no ensaio de activação do FX da proteína em estudo (ponto 3.4.2.1 dos Resultados e Discussão) foi muito superior ao verificado no teste com o veneno bruto (ponto 3.1.4.2 dos Resultados e Discussão) no qual foram usadas concentrações muito mais baixas de proteína (1 µg *versus* 30 µg). Estes dados indicam que, apesar de estarmos perante um estrato purificado, a proteína em estudo representa um componente minoritário no veneno bruto.

É de sublinhar novamente que muitos dos ensaios constantes neste trabalho foram feitos em paralelo, e neste caso sempre que se fazia uma purificação, executavam-se os ensaios para avaliar a activação do FX e da protrombina de todas as fracções obtidas. Foi através destes ensaios que foi possível perceber onde se localizavam as proteínas responsáveis por estas actividades e garantir que a mesma proteína que activa o FX não activa a protrombina, assumindo que não estaríamos presente da proteína descrita por M. B. Silva *et al.* (2003). As grandes dificuldades encontradas até à padronização da técnica de purificação final prendia-se com o facto das fracções encontrarem-se sempre com contaminantes de outras proteínas, impossibilitando a realização de um estudo cinético mais profundo.

O cálcio é um importante cofactor para algumas enzimas exercerem a sua função, por vezes essencial pois é ele que modula a sua conformação de modo a reconhecerem o seu substrato, como é o caso de algumas metaloproteases. Isto justifica o uso de cálcio no tampão usado para os ensaios de activação do FX.

O EDTA sendo um quelante de iões metálicos vai ligar-se às metaloproteases desprovidendo-as dos seus iões metálicos, formando também ligações com os iões metálicos em solução (cálcio) impedindo que seja usado pelas metaloproteases.

Existem metaloproteases que mantêm a sua actividade enzimática mesmo na ausência de cálcio, assim sendo, quando se ponderou usar o EDTA para averiguar se a enzima se tratava efectivamente de uma metaloprotease colocou-se a questão, se este iria apenas quelar o cálcio da reacção impedindo que a enzima exercesse a sua função ou, por outro lado, iria interagir directamente com a enzima sequestrando os seus iões metálicos ou alterando a conformação na tentativa.

Segundo Yamada *et al.* (1997) os venenos de serpentes não mostraram ter a capacidade de activar o FX na ausência de cálcio; contudo, o veneno de algumas serpentes mostrou ter actividade mesmo na ausência de cálcio, ainda que em menor proporção do que quando o cálcio está presente, assim como acontece com a proteína em estudo (ponto 3.4.3.1 dos Resultados e Discussão). Isto pode indicar que ou a proteína não necessita de todo de cálcio para exercer a sua função, sendo o cálcio um mero catalisador, ou por outro lado a proteína é capaz de exercer a sua função proteolítica com concentrações ínfimas de cálcio, mas suficientes para desencadear uma reacção (proveniente do próprio veneno bruto). Alvarez-Flores *et al.* (2011) também descreveu uma proteína (rLosac) que activa o FX sem a necessidade de cálcio, mas este aumenta a velocidade da reacção à semelhança do que foi observado. A independência do cálcio pode ser também uma característica das proteínas provenientes desta espécie de serpente, dado que a *berylthractivase* é capaz de activar a protrombina na ausência de cálcio e é igualmente uma metaloprotease, tal como a proteína em estudo.

O ensaio do veneno com os inibidores (ponto 3.4.3.2 dos Resultados e Discussão) é bastante importante, em particular com o EDTA, não só para tentar aferir a classe proteica mas também para perceber se os resultados são congruentes com o ensaio sem a adição de cálcio (ponto 3.4.3.1 dos Resultados e Discussão).

Os resultados obtidos no ensaio do veneno com os inibidores (ponto 3.4.3.2 dos Resultados e Discussão) são inesperados, não tendo havido qualquer inibição na reacção. Isto pode ser devido à concentração de inibidor não ser suficiente para haver inibição enzimática, o que de certa forma é improvável uma vez que a actividade não diminuiu de forma significativa comparativamente ao ensaio sem inibidor (ponto 3.4.2.1 dos Resultados e Discussão). Contudo a quantidade de EDTA pode não ter sido suficiente para promover a quelação de todo o cálcio utilizado na reacção. E como foi observado anteriormente na reacção sem cálcio (Figura 26), quantidades muito baixas são suficientes para promover reacção. Outra hipótese é

estar presente no veneno bruto mais de uma enzima activadora de FX de classes diferentes. Assim mesmo que haja inibição de uma a outra contínua activa.

Com estes resultados não se pode tirar nenhuma conclusão relativamente à classe da enzima responsável pela activação do FX, nem do mecanismo de acção responsável pela hipotética inibição enzimática caso se tratasse de uma metaloprotease. Contudo, estamos perante um estrato bruto com várias proteínas presentes. Pode-se apenas concluir que, na ausência ou presença de quantidades muito baixas de cálcio, a enzima responsável pela activação do FX continua a exercer a sua função, ainda que de forma mais lenta.

À semelhança do que aconteceu com os ensaios de activação, foram efectuados também ensaios de inibição com várias fracções provenientes das purificações, de modo a tentar perceber se existia mais do que uma classe activadora de FX. Contudo, os resultados foram pouco conclusivos, devido às constantes contaminações encontradas. Foram efectuados igualmente em paralelo ensaios de inibição com a protrombina e verificou-se uma inibição de actividade em algumas fracções com 5 mM de EDTA (Dinâmica<sup>®</sup>), indo ao encontro do que era encontrado na bibliografia. O mesmo nunca ocorreu com esta concentração de EDTA para a inibição do activador de FX. Assim sendo, decidiu-se aumentar a dose de EDTA neste ensaio, para perceber se a inibição ocorre apenas com elevadas concentrações de EDTA ou não ocorreria de todo. Como é possível observar na Figura 28, na concentração de 5 mM de EDTA (Dinâmica<sup>®</sup>) não houve inibição como era de prever. Esta concentração teve por base algumas referências, segundo as quais esta concentração é eficiente para inibir a acção de algumas SVMP (Komori, Nikai, & Sugihara, 1990). Com a concentração de 20 mM de EDTA (Dinâmica<sup>®</sup>) houve inibição total da activação do FX, podendo dever-se ao total sequestro de cálcio (possivelmente essencial à reacção) e/ou após o sequestro do cálcio da reacção ter havido interacção com os iões metálicos da proteína, alterando a sua conformação, impedindo que esta tenha a sua actividade proteolítica. Assim, com base em todos os resultados obtidos até agora, é possível garantir que a nossa proteína seja da classe das metaloproteases, muito possivelmente das zinco-metaloproteases classe II ou III, dada a sua semelhança com as proteínas descritas no ponto 3.3.1.2 dos Resultados e Discussão, ambas zinco-metaloproteases.

No que diz respeito ao ponto de clivagem (ponto 3.4.4 dos Resultados e Discussão), o modo de reconhecimento do local de clivagem (posição Glu<sub>310</sub>-Ser<sub>311</sub>) e as implicações biológicas desta diferença não são conhecidas mas é algo a considerar numa futura investigação.

#### 4. Conclusão

---

Os venenos de origem animal são abundantes fontes de péptidos e proteínas, sendo que muitos destes, quando purificados, têm provado ser ferramentas úteis em investigação biomédica, desenvolvimento de novos fármacos e na soroterapia antiveneno. Assim sendo, o proteoma dos venenos ofídicos é um verdadeiro desafio no entendimento das características e estrutura dos seus componentes, da patologia associada ao envenenamento e na exploração destas toxinas naturais altamente evoluídas para o uso farmacêutico e como meio de diagnóstico. O resultado destas investigações tem salvado e melhorado a qualidade de vida de muitas pessoas e tem potencial para ajudar muitas mais.

Neste trabalho não foi possível, por falta de tempo, executar todas as fases que são necessárias à completa caracterização de uma nova proteína bem como explorar metodologias que permitissem avaliar a sua actividade noutros alvos da cascata da coagulação.

No entanto, apesar do tempo reduzido e da complexidade da proteína a que se juntou a enorme dificuldade na sua purificação, foi possível concluir, através dos resultados dos ensaios efectuados neste estudo, que o veneno da serpente *B. erythromelas* possui diferentes proteínas que interagem a diferentes níveis da cascata da coagulação, tendo sido isolada uma proteína nunca evidenciada, capaz de activar o FX da coagulação e outra, já descrita, capaz de activar a protrombina. Concluiu-se ainda que a proteína em estudo é uma metaloprotease, possivelmente zinco-metaloprotease da classe II ou III.

A descoberta de novas actividades biológicas nos venenos de serpentes é constantemente descrita, sendo a maior parte atribuídas a algum tipo de toxina com estrutura já conhecida, tendo-se por rara a descoberta de novas classes de toxinas. Contudo, apesar da proteína em estudo não pertencer a uma nova classe proteica, ficou patente que apresenta algumas características que a torna diferente de outras mais bem estudadas e que, comparativamente, pode trazer algumas vantagens.

Os ensaios realizados sobre a proteína agora isolada e purificada indicam que esta proteína tem a capacidade de activar o FX, sendo contudo incapaz de activar a protrombina. Esta actividade e o facto do FX se localizar no ponto de convergência da via intrínseca e extrínseca, permite colocar a hipótese de que a proteína em causa possui potencial terapêutico, no que diz respeito à hemostase e também como potencial ferramenta em testes rápidos de diagnóstico ou em outros ensaios.

Os resultados obtidos e as conclusões retiradas do presente trabalho, permitem assim prosseguir, em trabalhos futuros, com os outros ensaios que se dirijam para uma mais

completa caracterização biológica e bioquímica da proteína, como por exemplo a sua resistência térmica e ao pH, a sua especificidade para o FX e o seu comportamento em ensaios *in-vivo*, podendo estes últimos averiguar possíveis efeitos no organismo para além da activação do FX o que pode abrir portas para o desenvolvimento de novos fármacos no tratamento de diversas patologias, como aconteceu com o *Amblyomin-X*, um agente anticoagulante que mostrou ter propriedades anti-tumorais.

Relativamente aos acidentes ofídicos, um esclarecimento mais profundo dos efeitos do activador de FX na coagulação sanguínea poderia ser interessante, dando um melhor entendimento dos sintomas induzidos pelo envenenamento. É assim visível que a continuação e o aprofundamento deste projecto possa ser visto como útil para explorar e avaliar ao máximo a potencialidade deste activador de FX.

Apesar de todos os possíveis benefícios da aplicação destes agentes, a complexidade de algumas moléculas dificulta a sua purificação de forma a manter a sua actividade biológica e a contaminação com outros componentes do veneno pode resultar em efeitos tóxicos. Existem ainda os potenciais riscos associados à toxicidade e imunogenicidade do uso destes agentes como agentes terapêuticos. Isto, contudo abre portas ao desenvolvimento de proteínas recombinantes de forma a evitar alguns destes riscos.

Um dos aspectos mais fascinantes da toxinologia é que não há limites para o número de questões interessantes no que diz respeito aos répteis venenosos e os seus venenos.



## Bibliografia

- Aird, S. D. (2004). Chromatographic behavior of Bothrops erythromelas phospholipase and other venom constituents on Superdex 75. *Prep Biochem Biotechnol*, 34(4), 345-364. doi: 10.1081/pb-200030993
- Alvarez-Flores, M. P., Furlin, D., Ramos, O. H. P., Balan, A., Konno, K., & Chudzinski-Tavassi, A. M. (2011). Losac, the First Hemolin that Exhibits Procoagulant Activity through Selective Factor X Proteolytic Activation. *Journal of Biological Chemistry*, 286(9), 6918-6928. doi: 10.1074/jbc.M110.167718
- Amaral, A. (1923). New genera and species of snakes. *Proc. New England zool. Club* 8, 85-105.
- Baker, G., & Gibson, P. (1936). A case of haemophilia treated with Russell viper venom. *The Lancet*, 227(5869), 428.
- Berling, I., & Isbister, G. K. (2015). Hematologic effects and complications of snake envenoming. *Transfus Med Rev*, 29(2), 82-89. doi: 10.1016/j.tmr.2014.09.005
- Bernardoni, J. L., Sousa, L. F., Wermelinger, L. S., Lopes, A. S., Prezoto, B. C., Serrano, S. M., . . . Moura-da-Silva, A. M. (2014). Functional variability of snake venom metalloproteinases: adaptive advantages in targeting different prey and implications for human envenomation. *PLoS One*, 9(10), e109651. doi: 10.1371/journal.pone.0109651
- Bezerra, M. M. (2000). *Comparação da Capacidade Neutralizante dos Antiseros Botrópicos Comercial e Monoespecífico Frente a Peçonha de B. erythromelas*. (Masters Thesis), Universidade Federal de Pernambuco.
- Bode, W., Grams, F., Reinemer, P., Gomis-Rüth, F. X., Baumann, U., McKay, D. B., & Stöcker, W. (1996). The metzincin-superfamily of zinc-peptidases. *Advances in experimental medicine and biology*, 389, 1-11.
- Boechat, A. L., Paiva, C. S., Franca, F. O., & Dos-Santos, M. C. (2001). Heparin-antivenom association: differential neutralization effectiveness in Bothrops atrox and Bothrops erythromelas envenoming. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 43(1), 7-14.
- Braud, S., Bon, C., & Wisner, A. (2000). Snake venom proteins acting on hemostasis. *Biochimie*, 82(9-10), 851-859. doi: 10.1016/S0300-9084(00)01178-0
- Broze, G. J., & Girard, T. J. (2012). Tissue factor pathway inhibitor: structure-function. *Frontiers in bioscience (Landmark edition)*, 17, 262-280.
- Butenas, S., & Mann, K. G. (2002). Blood coagulation. *Biochemistry. Biokhimiia*, 67(1), 3-12.
- Calmette, A. (1894). Contribution à l'étude du venin des serpents. Immunisation des animaux et traitement de l'envenimation. *Ann. Inst. Pasteur*, 8, 275-291.
- Calvete, J. J. (2009). Venomics: digging into the evolution of venomous systems and learning to twist nature to fight pathology. *J Proteomics*, 72(2), 121-126. doi: 10.1016/j.jprot.2009.01.018
- Calvete, J. J. (2010). Snake Venomics, Antivenomics, and Venom Phenotyping: The Ménage à Trois of Proteomic Tools Aimed at Understanding the Biodiversity of Venoms. In R. M. Kini, K. J. Clemetson, F. S. Markland, M. A. McLane & T. Morita (Eds.), *Toxins and Hemostasis: From Bench to Bedside* (pp. 45-72): Springer Science & Business Media.
- Calvete, J. J. (2013). Snake venomics: from the inventory of toxins to biology. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*, 75, 44-62. doi: 10.1016/j.toxicon.2013.03.020
- Camey, K. U., Velarde, D. T., & Sanchez, E. F. (2002). Pharmacological characterization and neutralization of the venoms used in the production of Bothropic antivenom in Brazil. *Toxicon*, 40(5), 501-509.

- Chen, H. S., Chen, J. M., Lin, C. W., Khoo, K. H., & Tsai, I. H. (2008). New insights into the functions and N-glycan structures of factor X activator from Russell's viper venom. *Febs j*, 275(15), 3944-3958. doi: 10.1111/j.1742-4658.2008.06540.x
- Cheng, A. C., Wu, H. L., Shi, G. Y., & Tsai, I. H. (2012). A novel heparin-dependent inhibitor of activated protein C that potentiates consumptive coagulopathy in Russell's viper envenomation. *J Biol Chem*, 287(19), 15739-15748. doi: 10.1074/jbc.M111.323063
- Chudzinski-Tavassi, A. M., Carrijo-Carvalho, L. C., Alvarez-Flores, M. P., & Andrade, S. A. (2014). Exogenous Procoagulant Factors as Therapeutic and Biotechnological Tools. *Journal of Blood Disorders & Transfusion*. doi: 10.4172/2155-9864.1000209
- Davie, E. W., Fujikawa, K., & Kiesel, W. (1991). The coagulation cascade: initiation, maintenance, and regulation. *Biochemistry*, 30(43), 10363-10370.
- Dias, G. S., Kitano, E. S., Pagotto, A. H., Sant'anna, S. S., Rocha, M. M., Zelanis, A., & Serrano, S. M. (2013). Individual variability in the venom proteome of juvenile *Bothrops jararaca* specimens. *J Proteome Res*, 12(10), 4585-4598. doi: 10.1021/pr4007393
- Doley, R., & Kini, R. M. (2009). Protein complexes in snake venom. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 66(17), 2851-2871. doi: 10.1007/s00018-009-0050-2
- Normas de produção e controle de qualidade dos soros antiofídicos, Diário Oficial da União, Portaria No. 174 C.F.R. (11 de Novembro de 1996).
- Esmon, C. T. (2000). Regulation of blood coagulation. *Biochim Biophys Acta*, 1477(1-2), 349-360.
- Esmon, C. T. (2014). Targeting factor Xa and thrombin: impact on coagulation and beyond. *Thromb Haemost*, 111(4), 625-633. doi: 10.1160/th13-09-0730
- Estevao-Costa, M. I., Rocha, B. C., de Alvarenga Mudado, M., Redondo, R., Franco, G. R., & Fortes-Dias, C. L. (2008). Prospection, structural analysis and phylogenetic relationships of endogenous gamma-phospholipase A(2) inhibitors in Brazilian *Bothrops* snakes (Viperidae, Crotalinae). *Toxicon*, 52(1), 122-129. doi: 10.1016/j.toxicon.2008.04.167
- Feitosa, R. F. G., Melo, I. M. L. A., & Monteiro, H. S. A. (1997). Epidemiologia dos acidentes por serpentes peçonhentas no Estado do Ceará - Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop*, 30(4), 295-301. doi: 10.1590/S0037-86821997000400004
- Fenwick, A. M., Gutberlet, R. L., Evans, J. A., & Parkinson, C. L. (2009). Morphological and molecular evidence for phylogeny and classification of South American pitvipers, genera *Bothrops*, *Bothriopsis*, and *Bothrocophias* (Serpentes: Viperidae). *Zoological Journal of the Linnean Society*, 156(3), 617-640. doi: 10.1111/j.1096-3642.2008.00495.x
- Flores, C. A., Zappellini, A., & Prado-Franceschi, J. (1993). Lipxygenase-derived mediators may be involved in in vivo neutrophil migration induced by *Bothrops erythromelas* and *Bothrops alternatus* venoms. *Toxicon*, 31(12), 1551-1559.
- Fox, J., Baramova, E. N., Shannon, J. D., Bjarnason, J. B., & Gonias, S. L. (1990). Interaction of hemorrhagic metalloproteinases with human alpha 2-macroglobulin. *Biochemistry*, 29(4), 1069-1074.
- Fox, J., & Bjarnason, J. B. (1994). Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. *Pharmacology & therapeutics*, 62(3), 325-372.
- Fox, J., & Serrano, S. M. T. (2005). Structural considerations of the snake venom metalloproteinases, key members of the M12 repolysin family of metalloproteinases. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*, 45(8), 969-985. doi: 10.1016/j.toxicon.2005.02.012
- Fox, J., & Serrano, S. M. T. (2007). Approaching the golden age of natural product pharmaceuticals from venom libraries: an overview of toxins and toxin-derivatives

- currently involved in therapeutic or diagnostic applications. *Current pharmaceutical design*, 13(28), 2927-2934. doi: 10.2174/138161207782023739
- Fox, J., & Serrano, S. M. T. (2008). Insights into and speculations about snake venom metalloproteinase (SVMP) synthesis, folding and disulfide bond formation and their contribution to venom complexity. *FEBS Journal*, 275(12), 3016-3030. doi: 10.1111/j.1742-4658.2008.06466.x
- Fox, J., & Serrano, S. M. T. (2009). Snake Venom Metalloproteinases. In S. P. Mackessy (Ed.), *Handbook of venoms and toxins of reptiles* (pp. 95-113). United States of America: CRC Press.
- Furtado, M. F., Maruyama, M., Kamiguti, A. S., & Antonio, L. C. (1991). Comparative study of nine Bothrops snake venoms from adult female snakes and their offspring. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*, 29(2), 219-226.
- Gonçalves, L. s. R. d. C., & Chudzinski-Tavassi, A. M. (2004). High molecular mass kininogen inhibits metalloproteinases of Bothrops jararaca snake venom. *Biochemical and biophysical research communications*, 318(1), 5359. doi: 10.1016/j.bbrc.2004.03.182
- Gopalakrishnakone, P., Abul, F., Ravindra, F., Gnanathanan, C. A., Habib, A. G., Yang, C.-C., & Rojnuckarin, P. (2015). Clinical Toxinology in Asia Pacific and Africa. *Clinical Toxinology in Asia Pacific and Africa*. doi: 10.1007/978-94-007-6386-9\_49
- Gowda, D. C., Jackson, C. M., Kurzban, G. P., McPhie, P., & Davidson, E. A. (1996). Core sugar residues of the N-linked oligosaccharides of Russell's viper venom factor X-activator maintain functionally active polypeptide structure. *Biochemistry*, 35(18), 5833-5837. doi: 10.1021/bi953043e
- Gutiérrez, J., Rucavado, A., & Escalante, T. (2009). Snake Venom Metalloproteinases: Biological Roles and Participation in the Pathophysiology of Envenomation. In S. P. Mackessy (Ed.), *Handbook of venoms and toxins of reptiles* (pp. 115-138). United States of America: CRC Press.
- Gutiérrez, J., Rucavado, A., Escalante, T., & Díaz, C. (2005). Hemorrhage induced by snake venom metalloproteinases: biochemical and biophysical mechanisms involved in microvessel damage. *Toxicon*, 45(8), 997-1011. doi: 10.1016/j.toxicon.2005.02.029
- Hsu, C.-C., & Huang, T.-F. (2010). Biological Activities of Snake Venom Metalloproteinases on Platelets, Neutrophils, Endothelial Cells, and Extracellular Matrices. In R. M. Kini, K. J. Clemetson, F. S. Markland, M. A. McLane & T. Morita (Eds.), *Toxins and Hemostasis: From Bench to Bedside* (pp. 723-734): Springer Science & Business Media.
- Hutton, R. A., & Warrell, D. A. (1993). Action of snake venom components on the haemostatic system. *Blood reviews*, 7(3), 176-189.
- ITIS. (2015). Integrated Taxonomic Information System on-line database. Retrieved 05/11/2015 <http://www.itis.gov>
- Jackson, C. M., & Nemerson, Y. (1980). Blood coagulation. *Annual review of biochemistry*. doi: 10.1146/annurev.bi.49.070180.004001
- Jorge, R. J., Monteiro, H. S., Goncalves-Machado, L., Guarnieri, M. C., Ximenes, R. M., Borges-Nojosa, D. M., . . . Pla, D. (2015). Venomics and antivenomics of Bothrops erythromelas from five geographic populations within the Caatinga ecoregion of northeastern Brazil. *J Proteomics*, 114, 93-114. doi: 10.1016/j.jprot.2014.11.011
- Karlsson, E. (1979). Chemistry of Protein Toxins in Snake Venoms. In C.-Y. Lee (Ed.), *Snake Venoms* (Vol. 52, pp. 159-212): Springer Berlin Heidelberg.
- Kelley, M., & Sagarin, K. (2014). Biology of the Reptilia. Retrieved 11/09/2015, from <http://4.bp.blogspot.com/-fxwftemcb64/Uw5nTKaTZXI/AAAAAAAAAL4/iOi1EIXuKM/s1600/snake+teeth+channels.jpg>

- Kini, R. M. (2011). Toxins in thrombosis and haemostasis: potential beyond imagination. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*, 9 Suppl 1, 195-208. doi: 10.1111/j.1538-7836.2011.04279.x
- Kini, R. M., Clemetson, K. J., Markland, F. S., McLane, M. A., & Morita, T. (2010). *Toxins and Hemostasis: From Bench to Bedside*: Springer Science & Business Media.
- Koklic, T., Chattopadhyay, R., Majumder, R., & Lentz, B. R. (2015). Factor Xa dimerization competes with prothrombinase complex formation on platelet-like membrane surfaces. *Biochem J*, 467(1), 37-46. doi: 10.1042/bj20141177
- Komori, Y., Nikai, T., & Sugihara, H. (1990). Isolation and characterization of factor X activator from the venom of *Vipera aspis aspis*. *Int J Biochem*, 22(9), 1053-1060. doi: 10.1016/0020-711X(90)90213-M
- Kornalík, F. (1985). The influence of snake venom enzymes on blood coagulation. *Pharmacology & therapeutics*, 29(3), 353-405.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680-685.
- Larréché, S., Mion, G., & Goyffon, M. (2008). Troubles de l'hémostase induits par les venins de serpents. *Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation*, 27(4), 302309. doi: 10.1016/j.annfar.2008.02.009
- Lee, W. H., Zhang, Y., Wang, W. Y., Xiong, Y. L., & Gao, R. (1995). Isolation and properties of a blood coagulation factor X activator from the venom of king cobra (*Ophiophagus hannah*). *Toxicon*, 33(10), 1263-1276.
- Lu, Q., Clemetson, J. M., & Clemetson, K. J. (2005). Snake venoms and hemostasis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 3(8), 1791-1799. doi: 10.1111/j.1538-7836.2005.01358.x
- Luan, D., Zai, M., & Varner, J. D. (2007). Computationally derived points of fragility of a human cascade are consistent with current therapeutic strategies. *PLoS Comput Biol*, 3(7), e142. doi: 10.1371/journal.pcbi.0030142
- Luna, K. P., Xavier, E. M., Pascoal, V. P., Martins-Filho, O. A., & Pereira, V. R. (2010). Humoral immune response of patients bitten by the snake *Bothrops erythromelas*. *Rev Soc Bras Med Trop*, 43(6), 731-732.
- Macfarlane, R. G., & Barnett, B. (1934). The haemostatic possibilities of snake-venom. *The Lancet*.
- Machado, T., Silva, V. X., & Silva, M. J. (2014). Phylogenetic relationships within *Bothrops neuwiedi* group (Serpentes, Squamata): geographically highly-structured lineages, evidence of introgressive hybridization and Neogene/Quaternary diversification. *Mol Phylogenet Evol*, 71, 1-14. doi: 10.1016/j.ympev.2013.10.003
- Mackessy, S. (2009). The Field of Reptile Toxinology Snakes, Lizards, and Their Venoms. In S. P. Mackessy (Ed.), *Handbook of venoms and toxins of reptiles* (pp. 3-23). United States of America: CRC Press.
- Mann, K. G. (1999). Biochemistry and physiology of blood coagulation. *Thromb Haemost*, 82(2), 165-174.
- Markland, F. S. (1997). Snake venoms. *Drugs*, 54 Suppl 3, 1-10.
- Markland, F. S., & Swenson, S. (2013). Snake venom metalloproteinases. *Toxicon*, 62, 3-18. doi: 10.1016/j.toxicon.2012.09.004
- Marlu, R., & Polack, B. (2012). Gla-domainless factor Xa: molecular bait to bypass a blocked tenase complex. *Haematologica*, 97(8), 1165-1172. doi: 10.3324/haematol.2011.055699
- Martins, A., Sousa, C., Barbosa, S., Toyama, H., Toyama, O., Aprigio, C., . . . Monteiro, S. (2005). Action of anti-bothropic factor isolated from *Didelphis marsupialis* on renal effects of *Bothrops erythromelas* venom. *Toxicon*, 46(6), 595-599. doi: 10.1016/j.toxicon.2005.06.004

- Martins, M., Marques, O., & Sazima, I. (2002). Ecological and phylogenetic correlates of feeding habits in Neotropical pitvipers of the genus *Bothrops*. *Biology of the Vipers*, 307-328.
- Matsui, T., Fujimura, Y., & Titani, K. (2000). Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1477(1-2), 146156. doi: 10.1016/S0167-4838(99)00268-X
- Maureane, H. (2003). Remodeling the Blood Coagulation Cascade. *Journal of Thrombosis and Thrombolysis*, 16(1/2), 17-20. doi: 10.1023/B:THRO.0000014588.95061.28
- McCleary, R. J., & Kini, R. M. (2013a). Non-enzymatic proteins from snake venoms: a gold mine of pharmacological tools and drug leads. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*, 62, 56-74. doi: 10.1016/j.toxicon.2012.09.008
- McCleary, R. J., & Kini, R. M. (2013b). Snake bites and hemostasis/thrombosis. *Thrombosis research*, 132(6), 642646. doi: 10.1016/j.thromres.2013.09.031
- McConnell, M. (2000). Overview of haemostasis. In M. Day, A. Mackin & J. Littlewood (Eds.), *BSAVA Manual of Canine and Feline Haematology and Transfusion Medicine* (pp. 165-172). England: BSAVA.
- McMichael, M. (2012). New models of hemostasis. *Top Companion Anim Med*, 27(2), 40-45. doi: 10.1053/j.tcam.2012.07.005
- MEROPS. (2015). MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitous. Retrieved 20/11/2015 <http://merops.sanger.ac.uk/cgi-bin/famsum?family=M12>
- Ministério da Saúde do Brasil. (2001). Manual de Diagnóstico e Tratamento de Acidentes por Animais Peçonhentos. *Fundação Nacional de Saúde*.
- Moura-da-Silva, A. M., & Baldo, C. (2012). Jararhagin, a hemorrhagic snake venom metalloproteinase from *Bothrops jararaca*. *Toxicon*, 60(3), 280-289. doi: 10.1016/j.toxicon.2012.03.026
- Moura-da-Silva, A. M., Cardoso, D. F., & Tanizaki, M. M. (1990). Differences in distribution of myotoxic proteins in venoms from different *Bothrops* species. *Toxicon*, 28(11), 1293-1301.
- Moura-da-Silva, A. M., Ramos, O. H., Baldo, C., Niland, S., Hansen, U., Ventura, J. S., . . . Eble, J. A. (2008). Collagen binding is a key factor for the hemorrhagic activity of snake venom metalloproteinases. *Biochimie*, 90(3), 484-492. doi: 10.1016/j.biochi.2007.11.009
- Öhler, M., Georgieva, D., Seifert, J., Bergen, M. v., Arni, R. K., Genov, N., & Betzel, C. (2010). The Venomics of *Bothrops alternatus* a Pool of Acidic Proteins with Predominant Hemorrhagic and Coagulopathic Activities. *Journal of Proteome Research*, 9(5), 24222437. doi: 10.1021/pr901128x
- Oliveira, F. N., Brito, M. T., Morais, I. C., Fook, S. M., & Albuquerque, H. N. (2010). Accidents caused by *Bothrops* and *Bothropoides* in the State of Paraíba: epidemiological and clinical aspects. *Rev Soc Bras Med Trop*, 43(6), 662-667.
- Paes Leme, A. F., Kitano, E. S., Furtado, M. F., Valente, R. H., Camargo, A. C., Ho, P. L., . . . Serrano, S. M. T. (2009). Analysis of the subproteomes of proteinases and heparin-binding toxins of eight *Bothrops* venoms. *PROTEOMICS*, 9(3), 733-745. doi: 10.1002/pmic.200800484
- Perchuc, A. M., & Wilmer, M. (2010). Diagnostic Use of Snake Venom Components in the Coagulation Laboratory. In R. M. Kini, K. J. Clemetson, F. S. Markland, M. A. McLane & T. Morita (Eds.), *Toxins and Hemostasis: From Bench to Bedside* (pp. 747-766): Springer Science & Business Media.
- Pereira, A. L., Fritzen, M., Faria, F., Motta, G., & Chudzinski-Tavassi, A. M. (2006). Releasing or expression modulating mediator involved in hemostasis by Berythraactivase and Jararhagin (SVMPs). *Toxicon*, 47(7), 788-796. doi: 10.1016/j.toxicon.2006.02.014

- Puy, C., Tucker, E. I., Matafonov, A., Cheng, Q., Zientek, K. D., Gailani, D., . . . McCarty, O. J. (2015). Activated factor XI increases the procoagulant activity of the extrinsic pathway by inactivating tissue factor pathway inhibitor. *Blood*, 125(9), 1488-1496. doi: 10.1182/blood-2014-10-604587
- Quijada-Mascareñas, A., & Wüster, W. (2009). Recent Advances in Venomous Snake Systematics. In S. P. Mackessy (Ed.), *Handbook of venoms and toxins of reptiles* (pp. 25-64). United States of America: CRC Press.
- Rodríguez-Acosta, A., Guerrero, B., & Sánchez, E. E. (2010). The Theory of Intraspecies Variation is Not the Exception, But Simply the Rule: The Diverse Hemostatic Activities of Snake Venoms. In R. M. Kini, K. J. Clemetson, F. S. Markland, M. A. McLane & T. Morita (Eds.), *Toxins and Hemostasis: From Bench to Bedside* (pp. 97-112): Springer Science & Business Media.
- Rojnuckarin, P. (2010). Snakebite-Induced Coagulopathy and Bleeding Disorders. In R. M. Kini, K. J. Clemetson, F. S. Markland, M. A. McLane & T. Morita (Eds.), *Toxins and Hemostasis: From Bench to Bedside* (pp. 699-710): Springer Science & Business Media.
- Sánchez, E. E., Rodríguez-Acosta, A., Cantu, E., & Guerrero, B. (2010). Antivenoms and Coagulation. In R. M. Kini, K. J. Clemetson, F. S. Markland, M. A. McLane & T. Morita (Eds.), *Toxins and Hemostasis: From Bench to Bedside* (pp. 711-722): Springer Science & Business Media.
- Sant'anna, S., Grego, K., Puerto, G., Antoniazzi, M., Jared, C., Candido, D., . . . Malaque, C. (2013). Animais venenosos: Serpentes, Anfíbios, Aranhas, Escorpiões e Insetos. *Instituto Butantan*.
- Santoro, M. L., & Sano-Martins, I. S. (1993). Different clotting mechanisms of Bothrops jararaca snake venom on human and rabbit plasmas. *Toxicon*, 31(6), 733-742. doi: 10.1016/0041-0101(93)90379-W
- Schattner, M., Fritzen, M., Ventura, J. d. S., Modesto, J. C. d. A., Pozner, R. G., Moura-da-Silva, A. M., & Chudzinski-Tavassi, A. M. (2005). The snake venom metalloproteases berythracivase and jararhagin activate endothelial cells. *Biological Chemistry*, 386(4), 369-374. doi: 10.1515/BC.2005.044
- Senise, L. V., Yamashita, K. M., & Santoro, M. L. (2015). Bothrops jararaca envenomation: Pathogenesis of hemostatic disturbances and intravascular hemolysis. *Exp Biol Med (Maywood)*. doi: 10.1177/1535370215590818
- Shenoy, A. K., Ramesh, K. V., Chowta, M. N., Adhikari, P. M., & Rathnakar, U. P. (2014). Effects of botropase on clotting factors in healthy human volunteers. *Perspect Clin Res*, 5(2), 71-74. doi: 10.4103/2229-3485.128024
- Siigur, E., Tonismagi, K., Trummal, K., Samel, M., Vija, H., Subbi, J., & Siigur, J. (2001). Factor X activator from Vipera lebetina snake venom, molecular characterization and substrate specificity. *Biochim Biophys Acta*, 1568(1), 90-98.
- Siigur, J., & Siigur, E. (2010). Activation of Factor X by Snake Venom Proteases. In R. M. Kini, K. J. Clemetson, F. S. Markland, M. A. McLane & T. Morita (Eds.), *Toxins and Hemostasis: From Bench to Bedside* (pp. 447-464): Springer Science & Business Media.
- Siigur, J., Tonismagi, K., Trummal, K., Aaspollu, A., Samel, M., Vija, H., . . . Siigur, E. (2005). Vipera lebetina venom contains all types of snake venom metalloproteases. *Pathophysiol Haemost Thromb*, 34(4-5), 209-214. doi: 10.1159/000092426
- Silva, M. (2002). *Estudo da Variabilidade Intraespecífica da Peçonha de Bothrops erythromelas Amaral, 1926 (Jararaca Malha de Cascavel)*. (Masters Thesis), Universidade Federal de Pernambuco, Recife.
- Silva, M. B., Schattner, M., Ramos, C. R. R., Junqueira-de-Azevedo, I. L. M., Guarnieri, M. C., Lazzari, M. A., . . . Chudzinski-Tavassi, A. M. (2003). A prothrombin activator

- from Bothrops erythromelas (jararaca-da-seca) snake venom: characterization and molecular cloning. *Biochemical Journal*, 369(1), 129. doi: 10.1042/BJ20020449
- Smith, M. C. (2011). Retrieved 13/09/2015, from <http://www.pbase.com/image/134153238>
- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., . . . Klenk, D. C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical biochemistry*, 150(1), 76-85. doi: 10.1016/0003-2697(85)90442-7
- Smith, S. (2011). Overview of Hemostasis. In D. J. Weiss & K. J. Wardrop (Eds.), *Schalm's veterinary hematology* (6th ed., pp. 635-707). USA: Blackwell Publishing Ltd.
- Smith, S. A., Travers, R. J., & Morrissey, J. H. (2015). How it all starts: Initiation of the clotting cascade. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 1-11. doi: 10.3109/10409238.2015.1050550
- Souza, G. H., Catharino, R. R., Ifa, D. R., Eberlin, M. N., & Hyslop, S. (2008). Peptide fingerprinting of snake venoms by direct infusion nano-electrospray ionization mass spectrometry: potential use in venom identification and taxonomy. *J Mass Spectrom*, 43(5), 594-599. doi: 10.1002/jms.1351
- Spronk, H. M., de Jong, A. M., Crijns, H. J., Schotten, U., Van Gelder, I. C., & Ten Cate, H. (2014). Pleiotropic effects of factor Xa and thrombin: what to expect from novel anticoagulants. *Cardiovasc Res*, 101(3), 344-351. doi: 10.1093/cvr/cvt343
- Suntravat, M., Nuchprayoon, I., & Perez, J. C. (2010). Comparative study of anticoagulant and procoagulant properties of 28 snake venoms from families Elapidae, Viperidae, and purified Russell's viper venom-factor X activator (RVV-X). *Toxicon*, 56(4), 544-553.
- Suntravat, M., Yusuksawad, M., Sereemasapun, A., Perez, J. C., & Nuchprayoon, I. (2011). Effect of purified Russell's viper venom-factor X activator (RVV-X) on renal hemodynamics, renal functions, and coagulopathy in rats. *Toxicon*, 58(3), 230-238. doi: 10.1016/j.toxicon.2011.05.007
- Takeda, S. (2010). Structural Aspects of the Factor X Activator RVV-X from Russell's Viper Venom. In R. M. Kini, K. J. Clemetson, F. S. Markland, M. A. McLane & T. Morita (Eds.), *Toxins and Hemostasis: From Bench to Bedside* (pp. 465-484): Springer Science & Business Media.
- Takeda, S., Igarashi, T., & Mori, H. (2007). Crystal structure of RVV-X: an example of evolutionary gain of specificity by ADAM proteinases. *FEBS Lett*, 581(30), 5859-5864. doi: 10.1016/j.febslet.2007.11.062
- Takeda, S., Takeya, H., & Iwanaga, S. (2012). Snake venom metalloproteinases: structure, function and relevance to the mammalian ADAM/ADAMTS family proteins. *Biochim Biophys Acta*, 1824(1), 164-176. doi: 10.1016/j.bbapap.2011.04.009
- Tans, G., & Rosing, J. (2001). Snake venom activators of factor X: an overview. *Haemostasis*, 31(3-6), 225-233.
- Teng, C. M., Wang, J. P., Huang, T. F., & Liao, M. Y. (1989). Effects of venom proteases on peptide chromogenic substrates and bovine prothrombin. *Toxicon*, 27(2), 161-167.
- Thakur, R., Chattopadhyay, P., & Mukherjee, A. K. (2015). Biochemical and pharmacological characterization of a toxic fraction and its cytotoxin-like component isolated from Russell's viper (*Daboia russelii russelii*) venom. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 168, 55-65. doi: 10.1016/j.cbpc.2014.12.001
- Theakston, R. D., & Reid, H. A. (1983). Development of simple standard assay procedures for the characterization of snake venom. *Bulletin of the World Health Organization*, 61(6), 949-956.
- UniProt. (2015). UniProt: a hub for protein information. *Nucleic Acids Res.* 43: D204-D212 (2015). Retrieved 03/2015 <http://www.uniprot.org/uniprot/Q8UVG0> & <http://www.uniprot.org/uniprot/P00742>

- Valenta, J. (2010a). Envenoming and Snakebite Treatment in Specific Snake Groups. In J. Valenta (Ed.), *Venomous Snakes: Envenoming, Therapy* (2 ed., pp. 85-234). New York: Nova Science Publishers.
- Valenta, J. (2010b). Snake Antivenoms. In J. Valenta (Ed.), *Venomous Snakes: Envenoming, Therapy* (2 ed., pp. 51-58). New York: Nova Science Publishers.
- Valenta, J. (2010c). Snake Venoms. In J. Valenta (Ed.), *Venomous Snakes: Envenoming, Therapy* (2 ed., pp. 27-50). New York: Nova Science Publishers.
- Valenta, J. (2010d). Snakebite: Therapy and Prevention. In J. Valenta (Ed.), *Venomous Snakes: Envenoming, Therapy* (2 ed., pp. 59-84). New York: Nova Science Publishers.
- Valenta, J. (2010e). *Venomous Snakes: Envenoming, Therapy* (2 ed.). New York: Nova Science Publishers.
- Valenta, J. (2010f). Zoological Basis. In J. Valenta (Ed.), *Venomous Snakes: Envenoming, Therapy* (2 ed., pp. 1-16). New York: Nova Science Publishers.
- Vasconcelos, C. M., Valenca, R. C., Araujo, E. A., Modesto, J. C., Pontes, M. M., Brazil, T. K., & Guarnieri, M. C. (1998). Distribution of <sup>131</sup>I-labeled Bothrops erythromelas venom in mice. *Braz J Med Biol Res*, 31(3), 439-443.
- Weinstein, S., Smith, T., & Kardong, K. (2009). Reptile Venom Glands: Form, Function, and Future. In S. P. Mackessy (Ed.), *Handbook of venoms and toxins of reptiles* (pp. 65-94). United States of America: CRC Press.
- Weiss, D. J., & Wardrop, K. J. (2011). *Schalm's veterinary hematology* (6th ed.). USA: Blackwell Publishing Ltd.
- Wen, F., & Malaque, C. (2013). Acidentes por animais peçonhentos no Brasil. *Instituto Butantan*.
- White, J. (2005). Snake venoms and coagulopathy. *Toxicon*, 45(8), 951-967. doi: 10.1016/j.toxicon.2005.02.030
- WHO. (2015). World Health Organization. Retrieved 30/09/2015, from <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs337/en/>
- Wood, J. P., Ellery, P. E., Maroney, S. A., & Mast, A. E. (2014). Biology of tissue factor pathway inhibitor. *Blood*, 123(19), 2934-2943. doi: 10.1182/blood-2013-11-512764
- www.kingsnake.com. (2015). Snakes. Retrieved 13/09/2015, from <http://www.kingsnake.com/reptilia-italia/zanneserpenti.jpg>
- Yamada, D., Sekiya, F., & Morita, T. (1997). Prothrombin and factor X activator activities in the venoms of Viperidae snakes. *Toxicon*, 35(11), 1581-1589.
- Zamunér, S. R., Cruz-Hofling, M. A., Corrado, A. P., Hyslop, S., & Rodrigues-Simioni, L. (2004). Comparison of the neurotoxic and myotoxic effects of Brazilian Bothrops venoms and their neutralization by commercial antivenom. *Toxicon*, 44(3), 259-271. doi: 10.1016/j.toxicon.2004.05.029
- Zappellini, A. (1991). *estudos biológicos e farmacológicos da peçonha de Bothrops erythromelas*. (Masters Thesis), Faculdade de Ciências Médicas da Universidade de Campinas, Campinas.
- Zhu, W., Wu, Z., Shen, S., Liu, J., Xiang, N., Liao, Y., . . . Chen, Q. (2015). Purification, Partial Characterizations, and N-Terminal Amino Acid Sequence of a Procoagulant Protein FV-2 from Daboia Russelli Siamensis (Myanmar) Venom. *J Biochem Mol Toxicol*. doi: 10.1002/jbt.21713



## Anexos

Anexo 1 - Tratamento genérico dependendo do acidente ofídico. Segundo Wen e Malaque (2013).

Conduta	Acidentes			
	Botrópico	Laquétrico	Crotálico	Elapídico
<b>Jejum:</b> inicialmente o doente deve permanecer em jejum, pelo risco de náuseas e vômitos, durante a infusão da soroterapia. Terminada a infusão do antiveneno, avaliar o quadro clínico do doente para autorização da ingestão de alimentos.	X	X	X	X
<b>Drenagem postural:</b> No caso de edema, manter o membro atingido elevado; reavaliar a conduta em caso de síndrome compartimental.	X	X	-	-
<b>Hidratação:</b> Manter hidratação adequada com cristalóides os mais cedo possível de modo a prevenir a insuficiência renal aguda.	X	X	X	-
<b>Analgesia:</b> Especialmente nos acidentes botrópico e laquétrico; em geral há boa resposta com dipirona. Se necessário, opioides; evitar anti-inflamatórios não esteróides.	X	X	X	X
<b>Antibiótico:</b> Na presença de infecção secundária, administrar antimicrobianos com actividade sobre bacilos gram-negativos (especialmente <i>Morganella</i> ), cocos gram-positivos e anaeróbios.	X	X	-	-
<b>Diuréticos:</b> Na presença de oligúria, com o doente já adequadamente hidratado, estimular a diurese com o uso de diuréticos de Ansa como a Furosemida.	X	X	X	-
<b>Procedimento cirúrgico:</b> Drenar abscesso no momento apropriado; desbridar áreas necróticas. Na suspeita de síndrome compartimental, avaliar de forma criteriosa a indicação de fasciotomia.	X	X	-	-
<b>Derivados de sangue:</b> Plasma fresco, crioprecipitado ou plaquetas não estão indicados para a correcção dos distúrbios na hemostase. A hemorragia espontânea cessa pouco após o início da seroterapia. Em caso de procedimentos invasivos/cirúrgicos antes da reversão da coagulopatia, pode ser necessário a reposição desses factores.	X	X	X	-
<b>Diálise:</b> Na presença de Insuficiência renal aguda, solicitar avaliação nefrológica.	X	X	X	-
<b>Ventilação mecânica:</b> Para os doentes com comprometimento da respiração.	-	-	X	X
<b>Profilaxia antitetânica:</b> Actualizar o boletim vacinal do doente.	X	X	X	X

Anexo 2 - Proteínas hemostáticas, cofactores, inibidores e suas funções. Segundo Schalm's Veterinary Hematology 6th edition (Weiss & Wardrop, 2011) e Butenas e Mann (2002).

Classificação funcional	Sigla	Nome usual	Nome anterior	Característica	Outros
Via extrínseca	TF	Factor tissular	Tromboplastina ou Factor III	Cofactor	Proteína integrante de membrana com aproximadamente 46kDa (S. A. Smith <i>et al.</i> , 2015).
	FVII	Factor VII	Pró-convertina	Zimogénio	Proteína glicada de aproximadamente 50 kDa. É sintetizada no fígado e a concentração plasmática é em torno de 10 nM (S. A. Smith <i>et al.</i> , 2015).
	FVIIa	Factor VIIa		Enzima	Ao contrário das outras enzimas da cascata da coagulação, há uma ínfima quantidade desta enzima em circulação sem que tenha havido um estímulo pro-coagulante. Associa-se ao FT para formar um complexo o qual activa o FX e FIX (S. A. Smith <i>et al.</i> , 2015).
Via de contacto	FXII	Factor XII	Factor de Hageman	Zimogénio	Proteína com aproximadamente 80 kDa. É sintetizada no fígado e a sua concentração plasmática é em torno de 375 nM (S. A. Smith <i>et al.</i> , 2015).
	FXIIa	Factor XIIa		Enzima	Activa a PK, o HMWK, o FXI e FXII (S. A. Smith <i>et al.</i> , 2015)
	PK	Pré-caliceína	Factor de Fletcher	Zimogénio	Sintetizada no fígado mas também em vários tecidos. Dependendo do grau de glicação, o seu peso molecular pode ser de 85 ou 88 kDa. A sua concentração plasmática é em torno de 490 nM, contudo 75% destes encontram-se ligados ao HMWK (S. A. Smith <i>et al.</i> , 2015).
	K	Caliceína		Enzima	Activa o FXII e cliva o HMWK (S. A. Smith <i>et al.</i> , 2015).
	HMWK	Cininogénio de alto massa molecular	Factor de Williams-Fitzgerald-Flaujeac	Cofactor	Sintetizada no fígado com 120 kDa. A sua concentração plasmática é cerca de 670 nM (S. A. Smith <i>et al.</i> , 2015). Permite a ligação da pré-caliceína ao FXII.
Via intrínseca	FXI	Factor XI		Zimogénio	Sintetizado no fígado com massa molecular de 160 kDa (Jackson & Nemerson, 1980).
	FXIa	Factor XIa		Enzima	Activa FIX (S. A. Smith <i>et al.</i> , 2015).
	FIX	Factor IX	Factor de Christmas ou Factor anti-hemofílico B	Zimogénio	Sintetizado no fígado e é uma proteína dependente de vitamina K de 57 kDa (Jackson & Nemerson, 1980). A ausência deste factor caracteriza-se pela hemofilia B.
	FIXa	Factor IXa		Enzima	Activa FX e forma complexo tenase com VIIIa (S. A. Smith <i>et al.</i> , 2015).

Classificação funcional	Sigla	Nome usual	Nome anterior	Característica	Outros
	FVIII	Factor VIII	Factor anti-hemolítico	Pro-cofactor	Circula associado ao factor von Willebrand, o qual só se desassocia quando é activado. A ausência deste factor caracteriza-se pela hemofilia A.
	FVIIIa	Factor VIIIa		Cofactor	Cofactor do FIX com o qual forma o complexo tenase que resulta na activação do FX (S. A. Smith <i>et al.</i> , 2015).
<b>Via comum</b> (via a partir da qual há convergência da via de contacto e da via intrínseca)	FX	Factor X	Factor de Stuart-Prower	Zimogénio	Sintetizado no fígado e é uma proteína dependente de vitamina K de 59 kDa (Jackson & Nemerson, 1980).
	FXa	Factor Xa		Enzima	Forma o complexo protrombinase juntamente com FVa para activar protrombina (S. A. Smith <i>et al.</i> , 2015).
	FV	Factor V	Pro-acelerina	Pro-cofactor	Tem aproximadamente 330 kDa (Lu <i>et al.</i> , 2005).
	FVa	Factor Va		Cofactor	Cofactor do complexo protrombinase o qual juntamente com o FXa activa a protrombina (S. A. Smith <i>et al.</i> , 2015).
	Pro	Protrombina	Factor II	Zimogénio	Sintetizada no fígado e é uma proteína dependente de vitamina K de 72,5 kDa (Jackson & Nemerson, 1980).
	Fg	Fibrinogénio	Factor I	Substrato	Sintetizada no fígado com cerca de 340 kDa (Jackson & Nemerson, 1980) e é a proteína da coagulação mais abundante em circulação.
	Fb	Fibrina		Produto final	A polimerização dos monómeros de Fb leva à formação de um coágulo.
	FXIII	Factor XIII	Factor estabilizante de fibrina	Zimogénio	Sintetizado no fígado e monócitos. Parte está em circulação (tetrâmero com 320 kDa) e a outra está nos grânulos $\alpha$ das plaquetas (dimétrico com 160 kDa) (Jackson & Nemerson, 1980).
	FXIIIa	Factor XIIIa		Enzima	Faz a reticulação polimérica dos monómeros de fibrina para estabilização do coágulo.
(presente em várias etapas da cascata da coagulação)	Ca <sup>2+</sup>	Cálcio	Factor IV	Ião metálico/Cofactor	Formas pontes entre os factores dependentes de vitamina K e as membranas fosfolipídicas (Jackson & Nemerson, 1980).
<b>Inibidores da coagulação</b>	$\alpha$ 1PI	$\alpha$ 1-inibidor protease	$\alpha$ 1-antitripsina		Inibe além da tripsina, a plasmina e os factores Xa e XIa.
	AT	Antitrombina	Antitrombina III		É uma glicoproteína produzida no fígado com 58 kDa. É dependente de sulfato de heparina para exercer a sua função. Inibe a trombina, o FIXa, o FXa, o FXIa, o FXIIa e a calicreína plasmática (Davie <i>et al.</i> , 1991).
	TFPI	Inibidor do factor tissular			Produzido e expresso à superfície das células endoteliais. Inibe o complexo FT/VIIa (irreversível) e o FXa

Classificação funcional	Sigla	Nome usual	Nome anterior	Característica	Outros
					(reversível).
	PC	Proteína C		Zimogénio	Protease séria produzida no fígado depende de vitamina K. É dependente de trombina para a sua activação. Inactiva, o FVa e o FVIIIa (Davie <i>et al.</i> , 1991).
	PS	Proteína S		Cofactor	É uma glicoproteína dependente de vitamina K. Age como cofactor da PC, aumentando a velocidade de degradação.
	TM	Trombomodulina		Cofactor	Receptor de membrana que regula a actividade da PC pela trombina.
<b>Fibrinólise</b>	PLG	Plasminogénio		Zimogénio	Sintetizado no fígado com 86 kDa (Jackson & Nemerson, 1980).
	PLM	Plasmina		Enzima	Forma activa do plasminogénio. Provoca a lise da fibrina, fibrinogénio, FV e VIII.
	uPA	Activador uroquinase do plasminogénio			Glicoproteína sintetizada nas células epiteliais do rim, fibroblastos e células endoteliais como pro-uroquinase. É activada pela plasmina ou a calicreína e activa o plasminogénio (McMichael, 2012).
	tPA	Activador tissular do plasminogénio			Produzido pelas células endoteliais em resposta a estímulos químicos (bradicinina, histamina, adrenalina, trombina e factor de activação plaquetário). Uma pequena fracção circula no plasma mas a maior parte está ligada ao seu inibidor ( PAI-1). Activa o plasminogénio. (McMichael, 2012).
<b>Inibidores da fibrinólise</b>	$\alpha$ 2-AP	$\alpha$ 2-antiplasmina	Inibidor da plasmina		Inibidor de várias proteases das quais se destacam a calicreína, a trombina e a plasmina, sendo o maior inibidor desta última.
	PAI-1	Inibidor do activador do plasminogénio-1		Enzima	Produzido por várias células como megacariócitos, células endoteliais, e hepatócitos. Maior inibidor de uPA e tPA.
	TAFI	Inibidor da fibrinólise activado pela trombina			Proteína sintetizada no fígado e libertada como zimogénio. Activado pela trombina e pela plasmina inibe a fibrinólise.
<b>Inibidores inespecíficos</b>	C1-INH	Inibidor da C1 esterase		Inibidor	Inibe a calicreína, o FXIa e FXIIa.

Anexo 3 - Actividade Biológica e origem de alguns SVMP estudados até agora. Segundo S. Takeda *et al.* (2012) e Fox e Serrano (2009).

SVMP	Origem	Actividade biológica
<b>Classe P-I</b>		
<b>Adamalysin II</b>	<i>Crotalus adamanteus</i>	Inibidor dos inibidores de proteases séricas
<b>Atrolysin C</b>	<i>Crotalus atrox</i>	Hemorrágico
<b>Atroxase</b>	<i>Crotalus atrox</i>	Fibrinolítico
<b>Fibrolase</b>	<i>Agkistrodon contortrix contortrix</i>	Fibrinolítico
<b>LHF-II</b>	<i>Lachesis muta muta</i>	Hemorrágico
<b>Acutolysin A</b>	<i>Agkistrodon acutus</i>	Hemorrágico
<b>BaP1</b>	<i>Bothrops asper</i>	Hemorrágico; inflamatório; mionecrosante
<b>H2-proteinase</b>	<i>Trimeresurus flavoviridis</i>	Proteolítico; não hemorrágico
<b>TM-3</b>	<i>Trimeresurus mucrosquamatus</i>	Fibrinogenolítico
<b>Acutolysin C</b>	<i>Agkistrodon acutus</i>	Hemorrágico
<b>FII</b>	<i>Agkistrodon acutus</i>	Fibrino(geno)lítico
<b>bmooMP<math>\alpha</math>-1</b>	<i>Bothrops moojeni</i>	Fibrino(geno)lítico
<b>HT-2</b>	<i>Crotalus rubber rubber</i>	Hemorrágico
<b>HR2A</b>	<i>Trimeresurus flavoviridis</i>	Hemorrágico
<b>Graminelysin-1</b>	<i>Trimeresurus gramineus</i>	Apoptose
<b>Classe P-II</b>		
<b>Atrolysin E</b>	<i>Crotalus atrox</i>	Hemorrágico
<b>MT-d</b>	<i>Agkistrodon halys brevicaudus</i>	Proteolítico
<b>Jerdonitin</b>	<i>Trimeresurus jedonii 1</i>	Inibidor da agregação plaquetária
<b>Bilitoxin-I</b>	<i>Agkistrodon bilineatus</i>	Hemorrágico
<b>Classe P-III</b>		
<b>P-IIIa/b</b>		
<b>Catrocollastatin/VAP2B</b>	<i>Crotalus atrox</i>	Apoptose; inibidor da agregação plaquetária
<b>Bothropasin</b>	<i>Bothrops jararaca</i>	Hemorrágico
<b>AaHIV</b>	<i>Agkistrodon acutus</i>	Hemorrágico
<b>Atragin</b>	<i>Naja atra</i>	Proteolítico
<b>K-like</b>	<i>Naja atra</i>	Proteolítico
<b>Atrolysin A</b>	<i>Crotalus atrox</i>	Hemorrágico; inibidor da agregação plaquetária
<b>Jararhagin</b>	<i>Bothrops jararaca</i>	Hemorrágico; inibidor da agregação plaquetária
<b>HR1A</b>	<i>Trimeresurus flavoviridis</i>	Hemorrágico
<b>HR1B</b>	<i>Trimeresurus flavoviridis</i>	Hemorrágico
<b>Kaouthiagin</b>	<i>Naja kaouthia</i>	Degradação do factor de vW; inibidor da agregação plaquetária
<b>Ecarin</b>	<i>Echis carinatus</i>	Activador de protrombina
<b>Berythracivase</b>	<i>Bothrops erythromelas</i>	Activador de protrombina
<b>HF3</b>	<i>Bothrops jararaca</i>	Hemorrágico, activador da fagocitose por macrófagos
<b>Acurhagin</b>	<i>Agkistrodon acutus</i>	Hemorrágico; inibidor da agregação plaquetária.
<b>P-IIIc</b>		
<b>VAP1</b>	<i>Crotalus atrox</i>	Apoptose
<b>HV1</b>	<i>Trimeresurus flavoviridis</i>	Apoptose
<b>P-IIId</b>		
<b>RVV-X</b>	<i>Daboia russelli</i>	Activador do FX
<b>VLFXA</b>	<i>Vípera lebetina</i>	Activador do FX
<b>Carinactivase</b>	<i>Echis carinatus</i>	Activador da protrombina
<b>Multactivase</b>	<i>Echis multisquamatus</i>	Activador da protrombina

Anexo 4 - Usos e aplicações de vários componentes de veneno de serpentes aplicados ao diagnóstico, à terapêutica clínica e à investigação científica. Segundo Perchuc e Wilmer (2010), Hutton e Warrell (1993) e (Chudzinski-Tavassi *et al.* (2014)).

	Componentes dos venenos de serpentes	Nome na molécula (exemplos)	Origem	Massa molecular (Da)	Característica funcional	Aplicações	Exemplos de ensaios baseados nos venenos
Aplicação como método laboratorial e/ou diagnóstico.	Enzimas <i>thrombin-like</i>	• Ancrod (Arvin)	• <i>Calloselasma rhodostoma</i> (antiga <i>Agkistrodon rhodostoma</i> )	• 48.000	• Serina endopeptidase	• Desfibrinação sanguínea para o ensaio dos produtos de degradação da fibrina; • Determinação do tempo de coagulação em amostras com heparina, hirudina ou anti-trombina;	• Perfakit®, usando reptilase; • Tempo de Reptilase® (botroxobin).
		• Batroxobin (Reptilase ou Defibrase)	• <i>Bothrops atrox</i>	• 29.100	• Serina endopeptidase	• Determinação de anomalias na polimerização do fibrinogénio; • Determinação de patologias associadas com a última fase da coagulação;	
		• Trombocytin	• <i>Bothrops atrox</i>	• 36.000	• Serina endopeptidase	• Preparação do plasma para a medição de antitrombina III; • Diferentes análises, incluindo: a função da fibrina e a activação do feedback positivo dependente de trombina.	
	Activadores de protrombina	• Ecarin	• <i>Echis carinatus</i>	• 56.000 ou 72.000	• Metaloprotease, independente de Ca <sup>2+</sup> pertencente ao grupo A	• Monitorar inibidores directos da trombina como a hirudina ou argatroban, em	• Tempo de coagulação de Ecarin, usando ecarin;

Componentes dos venenos de serpentes	Nome na molécula (exemplos)	Origem	Massa molecular (Da)	Característica funcional	Aplicações	Exemplos de ensaios baseados nos venenos
	• Insularinase A	• <i>Bothrops insularis</i>	• 22.639	• Metaloprotease, pertencente ao grupo A	amostras que contenham heparina ou citrato, bem como em doentes sob terapia anticoagulante; • Quantificação de protrombina em comparação com o método PIVKA-II; • Determinação de PIVKA em patologia hepática; • Diagnóstico de coagulação intravascular disseminada; • Estudo da formação da meizotrombina e novos inibidores da meizotrombina; • Preparação da meizotrombina e das formas não enzimáticas de trombina e meizotrombina; • Estudo de protrombina recombinante; • Detecção de lúpus anticoagulante; • Aplicação no método de distribuição do FV alelo selvagem e da mutação de Leiden.	• Método cromogénico de Ecarin, usando ecarin; • Método CA-1, usando carinactivase; • Tempo do veneno da serpente Taipan, usando activadores de protrombina da serpente taipan; • Pefakit® Resistencia à proteína C activa do FV de Leiden, usando RVV-V e noscarin.
	• Berythactivase	• <i>Bothrops erythromelas</i>	• 78.000	• Metaloprotease, pertencente ao grupo A		
	• Carinactivase-1	• <i>Echis carinatus</i>	• 87.000	• Metaloprotease, dependente de $Ca^{2+}$ pertencente ao grupo B		
	• Pseutarin C	• <i>Pseudonaja textilis</i>	• 250.000	• Serina endopeptidase, dependente de $Ca^{2+}$ e fosfolípidos, pertencente ao grupo C. Estruturalmente e funcionalmente semelhante ao complexo FXa/FVa de mamíferos.		
	• Trocarin D	• <i>Tropidechis carinatus</i>	• 46.515	• Serina endopeptidase, dependente de $Ca^{2+}$ , fosfolípidos e FVa pertencente ao grupo D. Estruturalmente semelhante ao FXa de mamíferos.		
	• Textarin	• <i>Pseudonaja textilis</i>	• 53.000	• Serina endopeptidase, dependente de $Ca^{2+}$ , fosfolípidos e FVa pertencente ao grupo D.		

Componentes dos venenos de serpentes	Nome na molécula (exemplos)	Origem	Massa molecular (Da)	Característica funcional	Aplicações	Exemplos de ensaios baseados nos venenos
	• Lopap	• <i>Lonomia obliqua</i>	• 69.000 ou 20.800	• Serina endopeptidase, actividade aumentada na presença de $\text{Ca}^{2+}$ . Estruturalmente semelhante aos membros da família das lipocalinas.		
Activadores de FV	• RVV-V	• <i>Daboia russelii</i>	• 29.000	• Serina endopeptidase	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Preparação do reagente usado no ensaio de FV no plasma;</li> <li>• Estudo de activação do FV e estudo de estrutura função do FVa;</li> <li>• Estudo e quantificação do FV alelo selvagem e da mutação de Leiden;</li> <li>• Monitorização da actividade de anticoagulantes.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Pefakit® Resistencia à proteína C activa do FV de Leiden, usando RVV-V e noscarin;</li> <li>• Perfakit®, usando RVV-V;</li> <li>• PiCT®, usando RVV-V.</li> </ul>
	• LVV-V (VLFVA)	• <i>Daboia lebetina</i>	• 28.400	• Serina endopeptidase		
	• Lonomin VI: a	• <i>Lonomia achelous</i>	-	• Metaloprotease		
Activadores de FX	• RVV-X	• <i>Daboia russelii</i>	• 92.880	• Metaloprotease dependente de $\text{Ca}^{2+}$	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Dosagem de FX (quer seja pelo método cromogénico ou por um método de meio de coagulação);</li> <li>• Dosagem do tempo de coagulação proporcional à concentração de FX;</li> <li>• Distinção entre deficiência de FVII e FX;</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tempo de Stypven™, usando RVV-X;</li> <li>• Detecção e confirmação de lúpus anticoagulante usando RVV-;</li> <li>• dRVVT, com recurso ao veneno bruto de <i>D. russelii</i>;</li> </ul>
	• VLFXA	• <i>Daboia lebetina</i>	• 89.400	• Metaloprotease dependente de $\text{Ca}^{2+}$		



Componentes dos venenos de serpentes	Nome na molécula (exemplos)	Origem	Massa molecular (Da)	Característica funcional	Aplicações	Exemplos de ensaios baseados nos venenos
		• <i>Bungarus faciatus</i>	• 70.000	• Serina endopeptidase dependente de Ca <sup>2+</sup>	• Detecção de lúpus anticoagulante; • Determinação da mutação de Leiden do FV; • Identificação dos locais de reconhecimento do FX; • Investigação dos efeitos da deglicolização no FX; • Aplicação no ensaio do factor 3 plaquetário.	• GradiLeiden V kit e ensaio semelhante CRYOcheck Clot APCR, usando o método de coagulação drVVT; • STA-STACLOT APC-R, usando activador FX do veneno de <i>Crotalus viridis helleri</i> .
	• Losac	• <i>Lonomia obliqua</i>	• 45.000	• Serina endopeptidase independente de Ca <sup>2+</sup>		
	Activadores da Proteína C	-	-	-	-	• Determinação da actividade da proteína C (quer seja pelo método cromogénico ou por um método de meio de coagulação); • Análise da via da proteína C; • Determinação da mutação de Leiden do FV; • Quantificação da actividade da proteína S; • Avaliação do risco de tromboembolismo.
Botrocetin®	• Botrocetin®	• <i>Bothrops neuwiedi</i>	• 22.000	• Proteína não enzimática	• Ensaios da agregação plaquetária dependente de FvW;	-

	Componentes dos venenos de serpentes	Nome na molécula (exemplos)	Origem	Massa molecular (Da)	Característica funcional	Aplicações	Exemplos de ensaios baseados nos venenos
						<ul style="list-style-type: none"> <li>• Determinação da doença de vW tipo IIA e da doença de Soulier Bernard;</li> <li>• Caracterização de anticorpos inibidores gerados na doença de vW e na síndrome vW auto-imune;</li> <li>• Análise de novos agentes anti trombóticos bloqueadores da interação com FvW;</li> <li>• Caracterização de plaquetas e FvW humanos e as suas mutações.</li> </ul>	
<b>Aplicação terapêutica</b>	Echistatin	• Echistatin	• <i>Echis carinatus</i>	• 52.000 ou 54.000	• Desintegrina	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Inibição da agregação plaquetária;</li> <li>• Estudo de glicoproteínas plaquetárias.</li> </ul>	-
	Ancrod	• Ancrod	• <i>Calloselasma rhodostoma</i>	• 26.570	• <i>Thrombin-like</i>	• Agente fibrinogenolítico.	• Viprinex.
	Batroxobin	• Batroxobin	• <i>Bothrops atrox</i>	• 43.000	• <i>Thrombin-like</i>	• Agente fibrinogenolítico.	• Reptilase; • Defibrase.
	rLopap	• rLopap	• Proteína recombinante	• 22.100	• Ativador de protrombina	• Agente hemostático.	-